

Université de Montréal

**Physiopathologie des maladies métaboliques héréditaires des
acyls-Coenzyme A révélée par l'étude d'un modèle animal déficient en 3-
hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A lyase**

Par

Nicolas Gauthier

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en
Biochimie

Décembre 2012

© Nicolas Gauthier, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Physiopathologie des maladies métaboliques héréditaires des acyls-
Coenzyme A révélée par l'étude d'un modèle animal déficient en 3-hydroxy-3-
méthylglutaryl-Coenzyme A lyase

Présentée par :

Nicolas Gauthier

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Luis A. Rokeach, président-rapporteur

Dr. Grant A. Mitchell, directeur de recherche

Dr. Yan Burelle, membre du jury

Dr Henri Brunengraber, examinateur externe

Dre Cheri Deal, représentante du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La plupart des conditions détectées par le dépistage néonatal sont reliées à l'une des enzymes qui dégradent les acyls-CoA mitochondriaux. Le rôle physiopathologique des acyls-CoA dans ces maladies est peu connue, en partie parce que les esters liés au CoA sont intracellulaires et les échantillons tissulaires de patients humains ne sont généralement pas disponibles. Nous avons créé un modèle animal murin de l'une de ces maladies, la déficience en 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL), dans le foie (souris HLLKO). HL est la dernière enzyme de la cétogenèse et de la dégradation de la leucine. Une déficience chronique en HL et les crises métaboliques aiguës, produisent chacune un portrait anormal et distinct d'acyls-CoA hépatiques. Ces profils ne sont pas prévisibles à partir des niveaux d'acides organiques urinaires et d'acylcarnitines plasmatiques. La cétogenèse est indétectable dans les hépatocytes HLLKO. Dans les mitochondries HLLKO isolées, le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ à partir du $[2-^{14}\text{C}]$ pyruvate a diminué en présence de 2-ketoisocaproate (KIC), un métabolite de la leucine. Au test de tolérance au pyruvate, une mesure de la gluconéogenèse, les souris HLLKO ne présentent pas la réponse hyperglycémique normale. L'hyperammoniémie et l'hypoglycémie, des signes classiques de plusieurs erreurs innées du métabolisme (EIM) des acyls-CoA, surviennent de façon spontanée chez des souris HLLKO et sont inductibles par l'administration de KIC. Une charge en KIC augmente le niveau d'acyls-CoA reliés à la leucine et diminue le niveau d'acétyl-CoA. Les mitochondries des hépatocytes des souris HLLKO traitées

avec KIC présentent un gonflement marqué. L'hyperammoniémie des souris HLLKO répond au traitement par l'acide N-carbamyl-L-glutamique. Ce composé permet de contourner une enzyme acétyl-CoA-dépendante essentielle pour l'uréogenèse, le N-acétylglutamate synthase. Ceci démontre un mécanisme d'hyperammoniémie lié aux acyls-CoA. Dans une deuxième EIM des acyls-CoA, la souris SCADD, déficiente en déshydrogénase des acyls-CoA à chaînes courtes. Le profil des acyls-CoA hépatiques montre un niveau élevé du butyryl-CoA particulièrement après un jeûne et après une charge en triglycérides à chaîne moyenne précurseurs du butyryl-CoA.

MOTS-CLEFS

Leucine, corps cétoniques, génétique biochimique, hypoglycémie, hyperammoniémie, cétogenèse, CASTOR, erreurs innées du métabolisme, syndrome de Reye, métabolisme énergétique

ABSTRACT

Most conditions detected by expanded newborn screening result from deficiency of one of the enzymes that degrade acyl-CoA esters in mitochondria. The role of acyl-CoAs in the pathophysiology of these disorders is poorly understood, in part because CoA esters are intracellular and samples are not generally available from human patients. We created a mouse model of one such condition, deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL), in liver (HLLKO mice). HL catalyses a reaction of ketone body synthesis and of leucine degradation. Chronic HL deficiency and acute crises each produced distinct abnormal liver acyl-CoA patterns, which would not be predictable from levels of urine organic acids and plasma acylcarnitines. In HLLKO hepatocytes, ketogenesis was undetectable. Measures of Krebs cycle flux diminished following incubation of HLLKO mitochondria with the leucine metabolite 2-ketoisocaproate (KIC). HLLKO mice also had suppression of the normal hyperglycemic response to a systemic pyruvate load, a measure of gluconeogenesis. Hyperammonemia and hypoglycemia, cardinal features of many inborn errors of acyl-CoA metabolism, occurred spontaneously in some HLLKO mice and were inducible by administering KIC. KIC loading also increased levels of several leucine-related acyl-CoAs and reduced acetyl-CoA levels. Ultrastructurally, hepatocyte mitochondria of KIC-treated HLLKO mice show marked swelling. KIC-induced hyperammonemia improved following administration of carglumate (N-carbamyl-L-glutamic acid), which bypasses an

acetyl-CoA-dependent reaction essential for urea cycle function, thus demonstrating an acyl-CoA-related mechanism for this complication. In a second animal model of an inborn error of acyl-CoA metabolism, short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD)-deficient mice, the main finding in liver acyl-CoAs is increased butyryl-CoA, particularly during fasting or after enteral loading with medium chain triglyceride precursor of butyryl-CoA.

KEYWORDS

Leucine, ketone body, biochemical genetics, hypoglycemia, hyperammonemia, ketogenesis, CASTOR, inborn errors of metabolism, Reye syndrome, energy metabolism

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Dr Grant Mitchell. Il m'a confié un projet des plus intéressants et a su me transmettre sa passion pour le métabolisme et la biochimie génétique. Discuter de mon projet a toujours été passionnant et j'en garderai de beaux souvenirs pendant longtemps.

Des remerciements vont également à tous les membres de mon laboratoire, du passé comme du présent : Meriem Semache, Linghe Pan, Mélanie Fortier, Krishnakant Soni, Stéphanie Casavant, Jiang Wei Wu et Han Yang. Je me dois de faire un remerciement spécial à Dr Shupeï Wang, une personne extraordinaire en plus d'un scientifique détenant une efficacité incroyable! Te côtoyer durant toutes ces années fut un réel bonheur!

Merci à Denise Carrier de l'animalerie et toute son équipe pour votre beau travail. Merci également à Mme Sandy Lalonde, responsable des étudiants qui est d'une gentillesse et d'une écoute sans pareil. Merci à Sylvie Julien pour l'aide énorme dans la mise en page de ma thèse.

Merci au Dr Orval Mamer qui a su me transmettre l'amour de la spectrométrie de masse et de son utilisation pour mieux comprendre le métabolisme. Merci au Dr François Lépine ainsi qu'à son assistant de recherche Sylvain Milhot, pour leur accueil dans le laboratoire et pour l'aide incommensurable apportée à la mise sur pied de la technique de MS. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions et de m'avoir fait sentir comme un membre à part entière de votre équipe.

Merci à Pierre Lavoie et à sa super équipe du Grand Défi. Tu es une inspiration, une motivation et je ne te remercierai jamais assez pour le soutien que tu m'as offert. Merci aussi à ton épouse Lynne pour avoir écrit un si beau poème qui est resté collé sur ma paillasse tout au long de mes études et qui a été une source d'inspiration. Merci à Anne Vigneault de la Fondation GO pour le soutien et la compréhension. À toute votre équipe ne lâchez pas votre bon travail!

Merci à mes amis qui ont dû endurer et pardonner mes absences, physiques ou mentales. Merci à ma gang de cyclistes pour m'avoir fait décrocher en pédalant pour une bonne cause. Merci à mes parents, André et Christine, qui ont toujours su m'encourager et me soutenir tout au long de mes études.

Finalement, je tiens à rendre hommage à ma femme, Émilie, qui a démontré une force incroyable durant mes études. En plus de donner naissances à nos deux fils, Olivier et Thomas, durant mon doctorat, elle a été d'un soutien et d'une patience incroyable. À mes deux fils, vous n'avez pas idée à quel point vous m'avez aidé en me sautant dans les bras et en me collant fort à chaque fois que je rentrais à la maison! Émilie, ton nom devrait apparaître au côté du mien sur le dessus de cette thèse avec un petit astérisque pour la mention suivante : Ces auteurs ont contribué de façon égale à ces travaux! Merci pour ton soutien, ton aide, ta compréhension et ton amour!

**Comme la rosée du matin permet à la fleur de pousser, la sueur de
l'effort permet à l'homme de vieillir en beauté!!**

P.H. Bergeron,
lors de son marathon complété en 5h41min à l'âge de 80 ans
La Baie, le 28 Octobre 2006

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| RÉSUMÉ..... | iii |
| ABSTRACT | v |
| REMERCIEMENTS..... | vii |
| TABLE DES MATIÈRES | xi |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | xiii |
| LISTE DES TABLEAUX | xvi |
| LISTE DES FIGURES | xvii |
| CHAPITRE 1 : INTRODUCTION..... | 1 |
| 1.1 Le métabolisme énergétique | 2 |
| 1.2 Voies métaboliques énergétiques..... | 3 |
| 1.2.1 Lipolyse..... | 6 |
| 1.2.2 β -oxydation des acides gras | 7 |
| 1.2.3 Glycolyse / Cycle de Krebs | 9 |
| 1.2.4 La voie de la cétogenèse | 11 |
| 1.2.5 La voie de la cétolyse | 13 |
| 1.3 L'implication de la cétogenèse et de la diète cétogène dans les maladies | 16 |
| 1.4 Coenzyme A..... | 19 |
| 1.5 CASTOR..... | 23 |
| 1.6 Toxines responsables phénomène CASTOR..... | 29 |
| 1.6.1 Hypoglycin A..... | 29 |
| 1.6.2 Valproyl-CoA..... | 30 |
| 1.6.3 Hopantenate | 31 |
| 1.7 Modèles animaux | 32 |
| 1.7.1 CPT..... | 32 |
| 1.7.2 VLCAD | 33 |
| 1.7.3 LCAD | 33 |
| 1.7.4 MCAD | 33 |
| 1.7.5 SCAD..... | 34 |

| | |
|---|-----|
| 1.7.6 Mitochondrial Trifunctional Protein..... | 35 |
| 1.7.7 M/SCHAD | 35 |
| 1.7.8 Déficience en biotinidase | 36 |
| 1.7.9 Méthylmalonyl-CoA mutase | 36 |
| 1.8 Hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A lyase (HL) | 37 |
| 1.9 Déficience humaine en HL..... | 44 |
| 1.10 Implication du laboratoire..... | 49 |
| 1.11 Mise en contexte et contribution de l'étudiant..... | 50 |
| 1.12 Objectif et Hypothèses du projet..... | 52 |
| 1.12.1 Hypothèse secondaires : | 53 |
| Chapitre 2 : Hereditary and acquired diseases of acyl-coenzyme A metabolism..... | 55 |
| Chapitre 3 : A liver-specific defect of acyl-CoA degradation produces hyperammonemia, hypoglycemia and a distinct hepatic acyl-CoA pattern..... | 99 |
| Chapitre 4 : The effect of fasting and medium chain triglyceride loading on acyl-CoA levels in liver of normal and short-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mice..... | 154 |
| Annexe | 166 |
| Chapitre 5 : DISCUSSION | 168 |
| 5.1 Le modèle HLLKO | 169 |
| 5.2 Les souris SCADD..... | 173 |
| 5.3 Retour sur les hypothèses initiales | 175 |
| CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS..... | 189 |
| BIBLIOGRAPHIE | 195 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|----------|---|
| 3HB | 3-hydroxybutyrate |
| 3HBDH | 3-hydroxybutyrate déshydrogénase |
| AcAc | Acétoacétate |
| AcAc-CoA | Acétoacétyl-CoA |
| AC-CoA | Acétyl-CoA |
| ADP | Adénosine bis-phosphate |
| ATGL | Adipose triglyceride lipase |
| ATP | Adénosine tris-phosphate |
| BCKADH | Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase |
| CASTOR | CoA Sequestration, Toxicity Or Redistribution |
| CHYL | Chylomicrons |
| CoA | Coenzyme A |
| CPT | Carnitine palmitoyltransférase |
| DIC | Décomposition induite par la collision |
| EIM | Erreurs innées du métabolisme |
| EIMAC | Erreurs innées du métabolisme de la dégradation des acyls-CoA |
| FA | Acides gras (Fatty acids) |
| Ftms | fourier-transform mass spectrometry |
| GC-MS | Gas-Chromatography Mass-spectrometer |

| | |
|------------|---|
| G-CoA | Glutaryl-CoA |
| HL | 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase |
| HLLKO | HL liver specific KO |
| HLHKO | HL heart specific KO |
| HMG-CoA | 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA |
| HPLC-MS | High performance liquid chromatography- mass spectrometry i.p. Intrapéritonéal |
| LCAD | Long-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| LC-CoA | Acyl-CoA à chaîne longue |
| LCHAD | Long-chain 3-hydroxyacyl CoA Déshydrogénase |
| LHS | Lipase hormono-sensible |
| <i>m/z</i> | ratio masse/charge |
| MCAD | Medium-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| MC-CoA | Acyl-CoA à chaîne moyenne |
| mHS | HMG-CoA synthase mitochondriale |
| MS | Spectrométrie de masse |
| OA | Acides organiques |
| PANK | Pantothénate kinase |
| PC | Pyruvate carboxylase |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PDH | Pyruvate déshydrogénase |

| | |
|-------------|---|
| RCR | Ratio du contrôle respiratoire |
| RMN | Résonnance magnétique nucléaire |
| SCAD | Short-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| SCADD | Déficiencia en short-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| SC-CoA | Acyl-CoA à chaîne courte |
| SCOT | Succinyl-CoA : 3-Oxoacid CoA Transférase |
| T2 | Mitochondrial AcAc-CoA thiolase |
| VLCAD | Very-long-chain acyl-CoA Déshydrogénase |
| VLDL | Lipoprotéines à très faible densité (very-low density lipoproteins) |
| KIC | alpha-ketoisocaproate |
| β -Ox | β -oxydation |

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Mutations dans le gène HMGCL

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Résumé des voies métaboliques énergétiques centrales à mon projet
- Figure 2 : Métabolisme des corps cétoniques
- Figure 3 : Résumé du métabolisme du CoA
- Figure 4 : Représentation schématique du phénomène CASTOR dans trois situations métaboliques
- Figure 5 : Physiopathologie des maladies de type CASTOR, la déficience en HL comme exemple
- Figure 6 : Compartimentation des voies de la cétogenèse et de la production du cholestérol
- Figure 7 : Diagramme en ruban de la structure d'HL humain
- Figure 8 : Représentation schématique de mutations présentement identifiées dans le gène HMGCL humain
- Figure 9 : Dosage des acyls-CoA à chaînes courtes dans le cœur de souris HLHKO et contrôles traitées ou non avec KIC

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Le métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est à la base de la vie. Son bon fonctionnement est essentiel au maintien d'une bonne qualité de vie et même simplement à la vie. Le glucose est le principal vecteur d'énergie pour les cellules. Les acides gras, bien qu'ils constituent une source moins rapide et directe que le glucose, sont également des apports essentiels.

Un dérèglement du métabolisme énergétique cause plusieurs conséquences graves pouvant aller jusqu'à la mort. Les mauvaises habitudes de vie peuvent perturber le métabolisme énergétique. Le nombre élevé de cas d'obésité, de diabète de type II et de maladies cardiaques qui sont observés actuellement en Amérique de Nord en témoigne. La perturbation du métabolisme énergétique peut également provenir d'une source génétique. Les erreurs innées du métabolisme (EIM) sont un groupe de maladies génétiques caractérisées par la dysfonction d'une enzyme ou d'une protéine impliquée dans le métabolisme cellulaire. Les EIM ont des conséquences directes sur l'équilibre du métabolisme énergétique. Le sujet central de cette thèse est l'étude d'une EIM à l'aide d'un modèle animal. L'objectif principal est de mettre à jour la chaîne d'événements reliant la déficience génique aux signes observés chez ces patients. L'étude d'un modèle animal ayant une

déficiences enzymatiques affectant le métabolisme énergétique permet d'observer la façon dont celui-ci est affecté et sa capacité d'adaptation.

Le métabolisme énergétique est très complexe. Je présenterai lors des prochains paragraphes, les voies métaboliques principales impliquées dans mes travaux.

1.2 Voies métaboliques énergétiques

Le métabolisme énergétique est composé de plusieurs voies métaboliques dont certaines ayant un rôle plus central que d'autres. Nous pouvons séparer ces différentes voies en fonction du précurseur principal, soit le glucose, les acides gras et les protéines. Dans le cadre de cette thèse, je vais mettre l'accent sur quelques voies centrales pertinentes à mon projet qui sont illustrées dans la Figure 1. La voie principale du métabolisme énergétique glucidique est sans aucun doute la glycolyse accompagnée du cycle de Krebs suivie de la chaîne respiratoire mitochondriale (Murray, 2000). Une autre voie majeure du métabolisme glucidique est la voie de la néoglucogénèse qui permet d'effectuer le rôle inverse de la glycolyse, soit de recréer du glucose. Ceci permet de régulariser le niveau de glucose sanguin (Murray, 2000). Pour ce qui est des acides gras, la voie principale est la lipolyse. Pour les protéines, il existe plusieurs voies de dégradation spécifiques des différents acides aminés produits par la protéolyse (Murray, 2000).

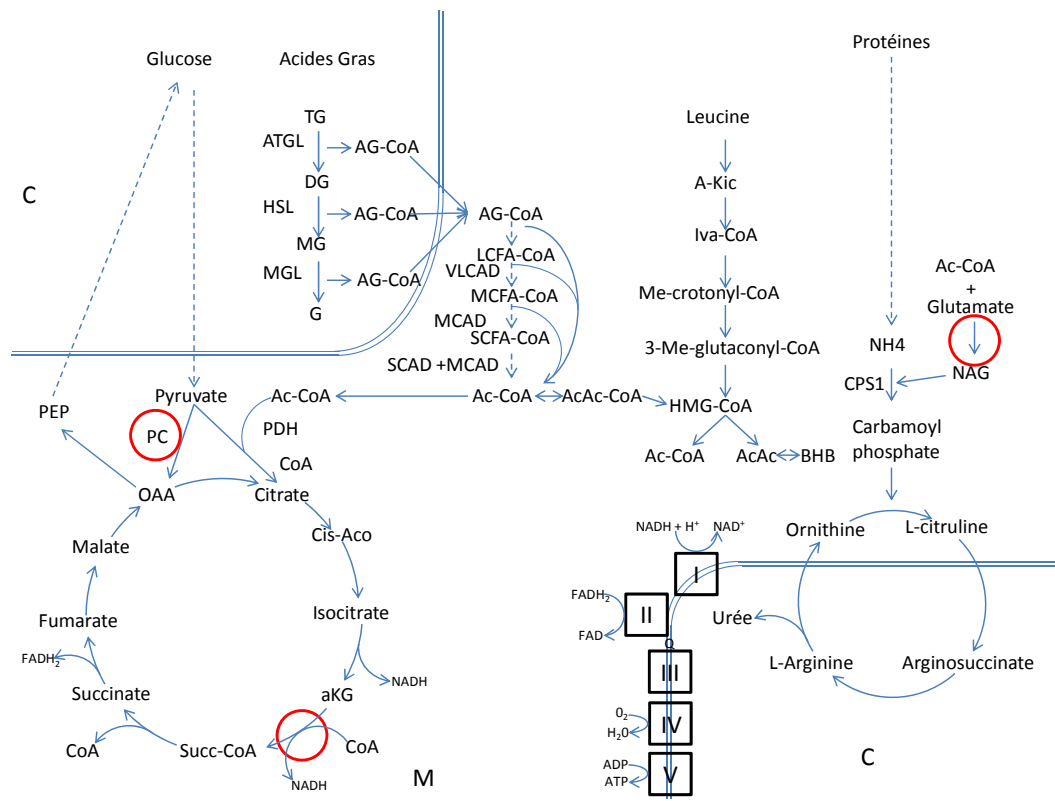


Figure 1 : Résumé des voies métaboliques énergétiques centrales à mon projet Les étapes à risque d'être perturbées par un phénomène CASTOR sont encerclé en rouge. C, Cytosol; M, Mitochondrie; TG, Triglycérides; DG, Diglycérides; MG, Monoglycérides; G, Glycérol; AG-CoA, Thioesters du Coenzyme A et des acides gras; ATGL, Adipose triglyceride lipase; HSL, Hormone sensitive lipase; MGL, Monoglyceride lipase; PEP, Phosphoenolpyruvate; Ac-CoA, Acétyl-CoA; PC, pyruvate carboxylase; PDH, Pyruvate dehydrogenase; CoA, Coenzyme A; Cis Aco, Cis-Aconitate; aKG, alpha-ketoglutarate; Succ-CoA, Succinyl-CoA; OAA, Oxaloacétate; LCFA-CoA, Acides gras à chaînes longues-CoA; VLCAD, Very long chain acyl-CoA dehydrogenase; MCFA-CoA, acides gras à chaînes moyennes-CoA; MCAD,

Medium chain acyl-CoA dehydrogenase; SCFA-CoA, Acides gras à chaînes courtes-CoA; SCAD, Short chain acyl-CoA dehydrogenase; AcAc-CoA, Acétoacétyl-CoA; α -KIC, acide α -ketoisocaproïque; IVA-CoA, Isovaléryl-CoA; Me-crotonyl-CoA, methylcrotonyl-CoA; 3-Me-glutaconyl-CoA, 3-méthylglutaconyl-CoA; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA; AcAc, Acetacétate; 3HB, 3-hydroxybutyrate; NAG, N-acétylglutamate; CPS1, carbamylphosphate synthase 1.

Les acides aminés sont les unités qui, une fois réunies, permettent de produire des chaînes polypeptidiques appelés protéines. Il existe 20 acides aminés qui composent la grande majorité des protéines (Murray, 2000). Il est possible de les séparer en sous-groupe en fonction de leur structure chimique. 9 acides aminés sont plutôt hydrophobes alors que 11 sont plutôt hydrophiles. Les acides aminés en surplus dans l'alimentation sont dégradés et non entreposés. Huit acides aminés sont considérés comme essentiels car il n'est pas possible de les produire chez l'humain. Ils doivent absolument faire partie de l'alimentation. Il s'agit de la phénylalanine, la leucine, la méthionine, la lysine, l'isoleucine, la valine, la thréonine et la tryptophane (Murray, 2000). Parmi les acides aminés à chaînes ramifiées, il y a la valine, la leucine et l'isoleucine. La valine est glycogénique, la leucine est cétogénique alors que l'isoleucine est à la fois glycogénique et cétogénique (Murray, 2000). Ces trois acides aminés passent par des étapes de dégradation similaires. Les deux premières étapes sont effectuées par les mêmes enzymes soit une

transaminase et une déshydrogénase. Les enzymes pour les réactions subséquentes sont spécifiques à chaque voie de dégradation. La protéolyse libère également de l'ammoniac (Murray, 2000). Comme l'hyperammoniémie est toxique (Tuchman et al., 2008), l'ammoniac est normalement transformé en urée par la voie de l'uréogénèse afin d'y être excrété dans l'urine.

1.2.1 Lipolyse

La lipolyse permet de libérer les acides gras qui sont entreposés sous forme de triglycérides. Il existe trois lipases majeures; ATGL (Adipose Triglyceride Lipase), LHS (lipase hormono-sensible) et MGL (monoglyceride lipase). ATGL est la lipase majeure pour les triglycérides, LHS cible les diglycérides et MGL, les monoglycérides (Wu et al., 2011).

Une fois que l'acide gras est libéré par la lipolyse, il peut entrer dans la mitochondrie afin d'y être dégradé et ainsi produire l'énergie nécessaire à la survie de la cellule. Afin d'y entrer, l'acide gras, sous forme d'un acyl-CoA, doit passer par le transporteur CPT (carnitine palmitoyltransférase) s'il possède une chaîne de carbone plus longue que 8 (Schuler and Wood, 2002). Celui-ci est composé de deux enzymes distinctes (CPT1 et 2). Le transport carnitine-dépendant des acyls-CoA à chaînes longues s'effectue en 4 étapes. Tout d'abord, la carnitine remplace le CoA et se lie au groupement acyl de l'acide

gras via CPT-1. Ensuite, la translocase carnitine/acyl-carnitine effectue une translocation de l'acyl-carnitine à travers les membranes externes et internes. Ensuite, le CPT-2 catalyse le relâchement de la carnitine du groupement acyl. Le groupement acyl est alors rattaché à un CoA à l'intérieur de la matrice mitochondriale pour former l'acyl-CoA qui va passer par la β -oxydation. Finalement, la translocase carnitine/acyl-carnitine, qui effectue le transfert de l'acyl-carnitine, échange simultanément un carnitine libre vers le cytosol (Schuler and Wood, 2002).

1.2.2 β -oxydation des acides gras

Une série d'étapes régissent la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Le transporteur/translocase CPT transfère l'acyl cytosolique sur la carnitine pour ensuite le réestérifier au CoA à l'intérieur de la mitochondrie (Schuler and Wood, 2002). Durant un cycle complet de β -oxydation, l'acide gras perd deux carbones et un acétyl-CoA est créé. La première réaction à l'intérieur de la mitochondrie est la déshydrogénation de l'acyl-CoA. Cette étape catalyse la formation d'un double lien trans-alpha, Beta (Schuler and Wood, 2002). Cette étape de déshydrogénase de l'acyl-CoA est effectuée par quatre enzymes différentes qui se sépareront la tâche selon la longueur de la chaîne carbonée de l'acyl. Ces enzymes sont nommées en fonction de la longueur de la chaîne pour laquelle elles possèdent la plus grande affinité (Figure 1) : Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (VLCAD, active pour

les chaînes longues), Medium-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (MCAD) et Short-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase (SCAD). La prochaine réaction, après l'hydroxylation de l'acyl-CoA, est effectuée par l'enoyl-CoA hydratase qui catalyse l'hydratation du double lien et forme le 3-hydroxyacyl-CoA. Celui-ci est dégradé par le 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, qui est également connu sous les termes Long-Chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) ou Medium-/Short-Chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (M/SCHAD). Encore une fois, la dénomination est donnée en fonction de la longueur de l'acyl. Cette réaction produit le 3-ketoacyl-CoA via une déshydrogénation NAD^+/NADH dépendante du 3-hydroxyacyl-CoA. Dans la dernière réaction du cycle, le 3-ketoacyl-CoA thiolase génère l'acétyl-CoA et l'acyl-CoA plus court de 2 carbones est disponible pour effectuer un autre cycle. La β -oxydation sera ainsi répétée jusqu'à ce que la chaîne de carbones de l'acide gras soit transformée en acétyl-CoA. Lorsque la chaîne de carbones est impaire, un acyl-CoA à 3 carbones (le propionyl-CoA) est généré pour ensuite être carboxylé et générer le methylmalonyl-CoA. L'enzyme methylmalonyl-CoA mutase va générer le succinyl-CoA qui pourra par la suite entrer dans le cycle de Krebs.

1.2.3 Glycolyse / Cycle de Krebs

La glycolyse est la principale voie de dégradation du glucose. Celle-ci est cytosolique et irréversible due à la présence de 3 réactions, soit celle transformant le glucose en glucose 6-phosphate; le fructose 6-phosphate en fructose 1,6-biphosphate et le phosphoénolpyruvate en pyruvate par les enzymes hexokinase (ou glucokinase dans les cellules hépatiques parenchymateuses et les îlots pancréatiques), phosphofructokinase et pyruvate kinase respectivement. Le bilan énergétique de la glycolyse est positif avec une production de 2 ATP et deux NADH, qui produiront 3 ATP chacun via la chaîne respiratoire mitochondriale en condition aérobiques. La voie de la glycolyse peut fonctionner en conditions aérobiques et anaérobiques mais alors il n'y a aura pas de NADH de produit car celui-ci est consommé pour la production du lactate à partir du pyruvate (Murray, 2000).

Le pyruvate ainsi créé pourra entrer dans la mitochondrie et alimenter le cycle de Krebs. Il existe 2 voies d'entrée principales du pyruvate vers le cycle de Krebs, soit via la pyruvate déshydrogénase (PDH) et la pyruvate carboxylase (PC). Les produits sont alors respectivement l'acétyl-CoA et l'oxaloacétate. L'entrée par la PDH permet l'oxydation alors que par la PC c'est l'anaplérose qui est effectuée. Le cycle de Krebs est une suite de dix réactions qui est alimentée par le pyruvate (voir figure 1). Le cycle de Krebs est entièrement intra-mitochondrial (Murray, 2000). Le coenzyme A est

impliqué à plusieurs étapes du cycle de Krebs, soit via la citrate synthase, l'alpha-ketoglutarate deshydrogénase et la succinyl-CoA synthétase. Un tour complet du cycle de Krebs permet la production d'un seul GTP via l'enzyme succinyl-CoA synthétase, mais produit 3 NADH (Isocitrate deshydrogénase, alpha-ketoglutarate deshydrogénase et malate deshydrogénase) et un FADH₂ (succinate deshydrogénase). Le NADH et le FADH₂ sont des substrats pour la chaîne respiratoire mitochondriale. Bien que le pyruvate soit considéré comme le point d'entrée majeur du cycle de Krebs, il existe d'autres points d'entrée et de sortie via de nombreuses autres enzymes et voies métaboliques.

Une de ces voies liées au cycle de Krebs est la néoglucogénèse. Il existe plusieurs points d'entrée à la néoglucogénèse. La presque totalité des substrats passe par le cycle de Krebs mais il est possible d'activer la néoglucogénèse par la dégradation du glycérol via les enzymes glycérol kinase et glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Ainsi, le fructose 1,6-biphosphate est créé. Sinon, lorsque les substrats (pyruvate, fumarate, alpha-ketoglutarate etc..) entrent via le cycle de Krebs, la néoglucogénèse passe par l'oxaloacétate via l'enzyme phospho-*enol*-pyruvate carboxykinase qui transforme l'oxaloacétate en phospho-*enol*-pyruvate (Murray, 2000). L'enzyme pyruvate carboxylase (PC) catalyse la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate. PC est régulée par la présence de l'acétyl-CoA. Il a été démontré que l'activité de PC est diminuée par de faibles concentrations

d'acétyl-CoA, mais également par la présence, en quantité importante, d'acyls-CoA à chaînes courtes dont HMG-CoA (Keech, 1985).

1.2.4 La voie de la céto-genèse

La céto-genèse est principalement hépatique et est activée lors de faible disponibilité de glucose telle que lors du jeûne et lors de charge élevée en protéines (Mitchell, 2001). Il existe 2 points d'entrée à la céto-genèse, soit les acides gras et la dégradation de la leucine. La céto-genèse produit les corps cétoniques (Figure 1). Les corps cétoniques sont des molécules à quatre carbones, l'acétoacétate (AcAc) et le β -hydroxybutyrate (3HB) (Mitchell, 2001). Ce sont d'importants vecteurs d'énergie pour les tissus extra-hépatiques tels que le cerveau auquel ils peuvent contribuer jusqu'à 60% de l'apport énergétique (Owen et al., 1967). Les corps cétoniques peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique et ainsi fournir un apport énergétique au cerveau. Cet apport énergétique provient des lipides ou des protéines pour ensuite pallier à une baisse de disponibilité du substrat habituel, le glucose.

Le niveau normal des corps cétoniques dans le sang à l'état nourri est de $< 0,3$ mM. Le taux sanguin fluctue en fonction du statut métabolique du patient. De façon normale, le niveau augmente lors du jeûne. L'hypercétonémie est caractérisée par un niveau de corps cétoniques de $> 2,0$ mM alors que l'acidocétose est définie par une concentration de $> 7,0$ mM

(Mitchell, 2001). En période de jeûne prolongé, le niveau des corps cétoniques est environ 50 à 65% du niveau sanguin dans le liquide céphalo-rachidien (Owen et al., 1974). Cette différence de concentration pourrait s'expliquer par un transfert limité dans le liquide céphalo-rachidien et une consommation importante des corps cétoniques par le cerveau. Les hautes concentrations de corps cétoniques sont associées à certaines conditions pathologiques telles que le diabète mal contrôlé. Un taux anormalement bas, voire pratiquement nul suite à un jeûne, est observé chez les patients présentant une déficience enzymatique de la cétogenèse. Le ratio plasmatique de 3HB/AcAc est normalement d'environ 1 et peut augmenter à 5-6 après une semaine de jeûne (Cahill et al., 1966; Marliss et al., 1978; Owen et al., 1969). La transition entre le 3HB et l'AcAc est effectuée par l'enzyme 3HBDH. Notons que la réaction de 3HBDH est NAD-dépendante et réversible. Pour cette raison, l'équilibre entre l'AcAc et le 3HB reflète l'état redox intra-mitochondrial.

La cétogenèse est principalement active au niveau du foie et ce, majoritairement lors d'épisodes de jeûne. Elle est régulée à trois niveaux (Mitchell et al., 1995) : 1) par l'activité lipolytique dans les adipocytes par les lipases telles que la lipase hormono-sensible (Fortier et al., 2004) et l'ATGL (adipose triglyceride lipase) (Haemmerle et al., 2006). Ces lipases fournissent les acides gras pour la cétogenèse. 2) par le niveau hépatique de malonyl-CoA. Ce dernier est synthétisé par l'acétyl-CoA carboxylase et dégradé par la malonyl-CoA décarboxylase. Le malonyl-CoA inhibe la carnitine palmitoyl

transférase (CPT1) (Mitchell, 2001), l'enzyme responsable de l'entrée des acides gras au niveau mitochondriale. 3) via l'enzyme HMG-CoA synthase mitochondriale (mHS) (Mitchell, 2001). L'activité de la mHS est augmentée en période de jeûne, par le diabète de type 1 (Serra et al., 1993), par l'administration d'une diète élevée en acides gras et durant la période postnatale. Le contrôle de mHS est exercé autant au niveau de son ARNm qu'au niveau post-traductionnel à l'aide d'une succinylation réversible qui inhibe son activité (Mitchell, 2001).

1.2.5 La voie de la cétolyse

La cétolyse permet l'utilisation des corps cétoniques comme source d'énergie alternative au glucose dans les tissus extrahépatiques (Figure 2) (Mitchell, 2001). Grâce à la réversibilité de la réaction de 3HBDH, le 3HB est reconverti en AcAc. Ce dernier est estérifié en AcAc-CoA par l'enzyme succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase (SCOT). Par la suite, l'enzyme T2 (mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase) convertit l'AcAc-CoA en acétyl-CoA qui pourra être utilisé dans le métabolisme énergétique (ex.: cycle de Krebs). L'enzyme SCOT et par le fait même, la cétolyse, sont exclusivement extrahépatiques. Donc, le foie, principal producteur de corps cétoniques, ne peut pas les utiliser et ainsi la possibilité d'un cycle futile est évitée. La capacité d'effectuer la cétolyse dans les différents tissus varie directement en fonction de l'expression de SCOT : cœur (désigné comme 100%) > rein (70%)

> cerveau (10%) > muscles squelettiques (5%) > foie (indétectable) (Mitchell, 2001). L'utilisation des corps cétoniques est proportionnelle au taux circulant dans le sang. Malgré cela, après 2 semaines de jeûne, le niveau sanguin des corps cétoniques augmente malgré un niveau de céto-genèse constant. Ceci suggère que la céto-lyse pourrait être diminuée lors du jeûne prolongé. D'ailleurs, une concentration d'AcAc supérieure à 5 mM inhibe l'activité de SCOT (Fenselau and Wallis, 1974), mais il n'existe aucune preuve que cette inhibition soit physiologiquement significative.

Il existe des déficiences connues pour chacune des deux enzymes de la céto-lyse (Mitchell, 2001). La déficience en SCOT (OMIM245050) est caractérisée par une mutation dans le gène OXCT sur le chromosome 5p12-p13. La déficience en T2 (OMIM 203750) survient lors de la présence de mutation sur le gène ACAT1 situé sur le chromosome 11q22.3-q23.1. Ces deux maladies se manifestent par des épisodes d'acidocétose sévère provoqués souvent par le jeûne, et ce, typiquement dans un contexte d'infection virale (Mitchell, 2001).

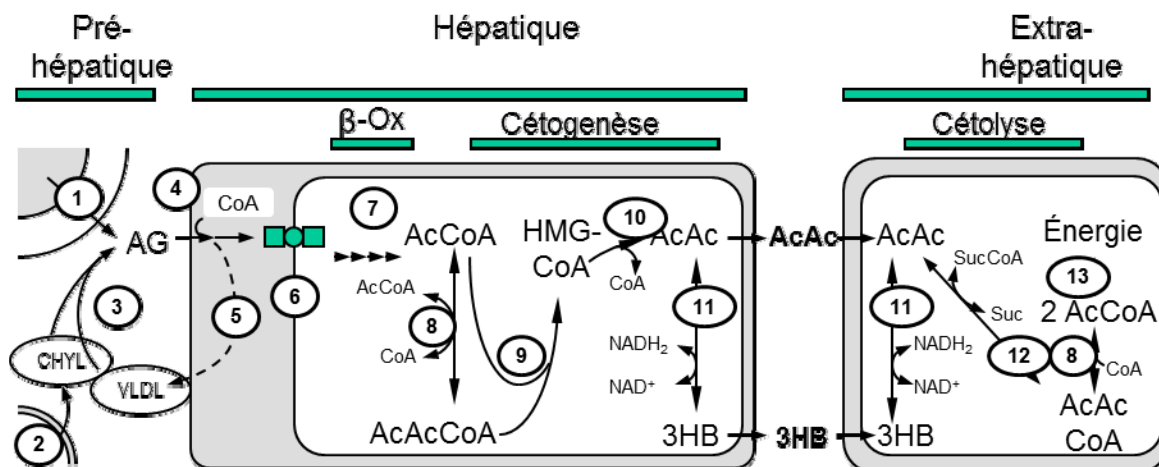


Figure 2 : Métabolisme des corps cétoniques. (Fukao et al., 2004) Les étapes majeures du métabolisme sont numérotées dans la figure 2. Durant le jeûne, les acides gras circulants sont dérivés majoritairement de la lipolyse adipocytaire (1). Dans des conditions d'abondance en nutriments, les triglycérides sont présents à des niveaux élevés dans les lipoprotéines circulantes telles que les chylomicrons (CHYL, 2) et les lipoprotéines à très faible densité (VLDL). Les triglycérides des lipoprotéines sont clivés par les lipases endothéliales pour relâcher les acides gras non-estérifiés (3). À l'intérieur de la cellule, les acides gras sont activés en acyl-CoA à longues chaînes par l'acyl-CoA synthase (4). Les acyls-CoA ainsi produits vont être utilisés soit pour la synthèse de triglycérides dans les lipoprotéines (5), dans les phospholipides, dans les sphingolipides ou pour la conversion en esters de carnitine pour le transport dans la mitochondrie pour l'oxydation (6). Dans la matrice mitochondriale, les acyls-CoA provenant des acides gras sont dégradés par les cycles de la β -oxydation (7). Chaque cycle produit une molécule d'AcCoA en plus d'une molécule de NADH, une de $FADH_2$ et un

acyl-CoA raccourci de deux carbones. Il existe plusieurs types d'enzymes dans la β -oxydation, avec une spécificité pour les acyls-CoA à chaînes longues ($>C_{12}$), à chaînes moyennes (C_6-C_{12}) et à chaînes courtes (C_4). La concentration intracellulaire d'AcCoA et d'AcAcCoA est équilibrée par l'action de l'AcAc-CoA thiolase mitochondriale (T2) (8). HMG-CoA est synthétisé par l'action de la mHS (9), pour ensuite être clivé par l'HL (10) pour produire de l'AcAc libre. AcAc peut être converti de façon réversible en 3HB par l'enzyme R-3HB déshydrogénase (3HBDH, 11). Le ratio de 3HB sur AcAc reflète l'état redox à l'intérieur de la matrice mitochondriale. AcAc et 3HB diffusent dans la circulation. Dans les tissus extrahépatiques, l'AcAc est activé en AcAcCoA par SCOT (12). L'AcCoA, produit par l'action de T2, peut ensuite se diriger vers l'oxydation et alimenter la synthèse d'ATP (13, pas illustré en détail dans la figure 3).

1.3 L'implication de la cétogenèse et de la diète cétogène dans les maladies

La cétogenèse est impliquée de façon secondaire dans plusieurs maladies. Dans le diabète de type 1, la cétogenèse est particulièrement active. La présence d'une forte concentration de corps cétoniques est fréquente chez le diabétique de type 1 (Mitchell et al., 1995). Étant donné que le diabète mal contrôlé entraîne une réaction métabolique liée habituellement

à un état de jeûne, les voies métaboliques productrices d'énergie telles que la céto-genèse, sont fortement activées. Le niveau plasmatique de corps cétoniques retrouvé chez un diabétique peut excéder 23 mM (Mitchell et al., 1995).

La céto-genèse est également induite comme traitement de l'épilepsie. En effet, la diète céto-gène est une avenue thérapeutique pour diminuer les crises chez le patient épileptique (Swink et al., 1997). Cette diète est caractérisée par une teneur élevée en acides gras. Dans une formulation typique de cette diète (4 : 1), 87% de l'énergie provient des acides gras alimentaires alors qu'en moyenne dans la diète nord-américaine standard, il s'agit d'environ 35% (Mitchell et al., 1995). L'appellation 4 : 1 indique le rapport entre la masse de lipides et la masse de glucides. En clinique, ce rapport est ajusté selon l'effet anticonvulsivant et le niveau des corps cétoniques sanguin. La haute teneur d'acides gras dans la diète induit une activation de la céto-genèse et entraîne une céto-se chez le patient. La concentration des corps cétoniques dans le sang peut atteindre des niveaux aussi élevés que 4 mM de 3HB et 1,5 mM d'AcAc chez certains patients.

Il est reconnu depuis longtemps que la céto-se a un effet anticonvulsivant et diminue la fréquence des crises dans plusieurs types d'épilepsie (Huttenlocher, 1976). Toutefois, l'utilisation thérapeutique de la

diète cétogénique a ses limites. Le problème le plus fréquemment rencontré est le manque de compliance du régime puisqu'une légère ingestion de glucides provoque une diminution rapide du niveau de corps cétoniques et favorise le retour des crises. Ce problème de compliance peut être expliqué, entre autres, par la non-palatabilité de la diète et par la présence non-suspectée du glucose, par exemple dans certains médicaments et sirops. De plus, la diète cétogène peut causer de l'obésité et peut également produire une déficience de certains nutriments (Dodson et al., 1976). La mise au point de la diète et le suivi des patients doivent être effectués par un diététiste expérimenté.

La diète cétogène est également utilisée dans la déficience en pyruvate déshydrogénase (PDH) (Falk et al., 1976). Le patient déficient en PDH ne peut produire l'acétyl-CoA à partir du pyruvate. La diète cétogène permettra d'offrir une source alternative d'acétyl-CoA par la β -oxydation des acides gras et dans les tissus extra-hépatiques par l'entremise des corps cétoniques et de la cétolyse.

Une forme modifiée de régime hyperlipidique est employée dans des approches de perte de poids telles que le régime Atkins et la diète South Beach. Celles-ci privilégient, en effet, une faible ingestion de glucides et favorise les protéines et les lipides. Ces derniers représentent environ 50 à

65% des sources d'énergie dans l'alimentation. Bien qu'efficace dans la perte de poids, la communauté scientifique émet des mises en garde face à l'adoption d'une telle diète. Quelques cas répertoriés dans la littérature ont eu de graves problèmes de santé avec des signes sévères tels qu'une acidocétose, des douleurs abdominales, des vomissements fréquents et une stéatose hépatique lors de l'adoption d'un tel régime (Chalasani and Fischer, 2008; Chen et al., 2006; Shah and Isley, 2006). La situation revenait à la normale après l'abandon de la diète et un retour à un apport glucidique normal. Il est intéressant de constater que les 3 cas présentés dans la littérature ont suivi une diète avec une très forte réduction de l'apport glucidique (moins de 20 g par jour).

1.4 Coenzyme A

Le coenzyme A (ou CoA) est produit à partir de l'acide pantothénique (Figure 3), une vitamine (B5) abondamment retrouvée dans l'alimentation (Murray, 2000). La première enzyme, la pantothénate kinase (PANK) possède 4 isoformes et est l'étape limitante de la voie. PANK 2 est le seul isoforme mitochondrial (Johnson et al., 2004). La déficience en PANK 2 a été identifiée comme étant la cause du syndrome d'Hallervorden-Spatz chez l'humain (Hayflick et al., 2003). Suite à cette découverte, le syndrome a été renommé PKAN (Panthotenate-Kinase-Associated Neurodegeneration) (Hayflick, 2003). La maladie a été renommée ainsi dû au fait que le Dr Hallervorden a effectué

des études sur les cerveaux des victimes tuées par les Nazi durant la 2e guerre mondiale (Shevell, 2003). Étant donné le contexte de cette découverte, la communauté scientifique a préféré lui attribué une dénomination scientifique plutôt qu'une dénomination basée sur celui qui est à l'origine de la découverte de la maladie. Les signes de la déficience en PANK 2 sont une dystonie et une rétinopathie chez l'enfant et des troubles neuropsychiatriques et du langage chez l'adulte. De plus, les patients présentent un patron spécifique lors de l'examen du cerveau par IRM.

Il a été démontré qu'une augmentation du pantothénate dans l'alimentation peut accroître le contenu hépatique en CoA (Lahjouji et al., 2001). Le CoA et les acyls-CoA ne traversent pas librement les membranes biologiques. Il y a toutefois présence d'un système d'import mitochondrial dépendant du potentiel membranaire impliquant un système de transporteur (Tahiliani, 1989). L'injection intraveineuse de 55 $\mu\text{mol/kg}$ de CoA libre chez le rat a permis une augmentation d'environ 1.5x la concentration hépatique de CoA (Tholen and Mordhorst, 1976), mais sa localisation intracellulaire n'a pas été déterminée lors de cette étude. Ces travaux laissent croire qu'une charge en CoA pourrait augmenter la concentration intracellulaire du CoA. Malgré tout, il manque de nombreuses données à notre connaissance de la synthèse du CoA, de sa dégradation et des méthodes qui permettraient de manipuler sa concentration. L'importance de PANK2 dans la synthèse mitochondriale du CoA n'est toujours pas prouvée, malgré une

activité PANK démontrée (Kotzbauer et al., 2005; Tahiliani and Beinlich, 1991).

Le CoA est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, la néoglucogenèse, l'uréogenèse ainsi que plusieurs voies de dégradation protéique.

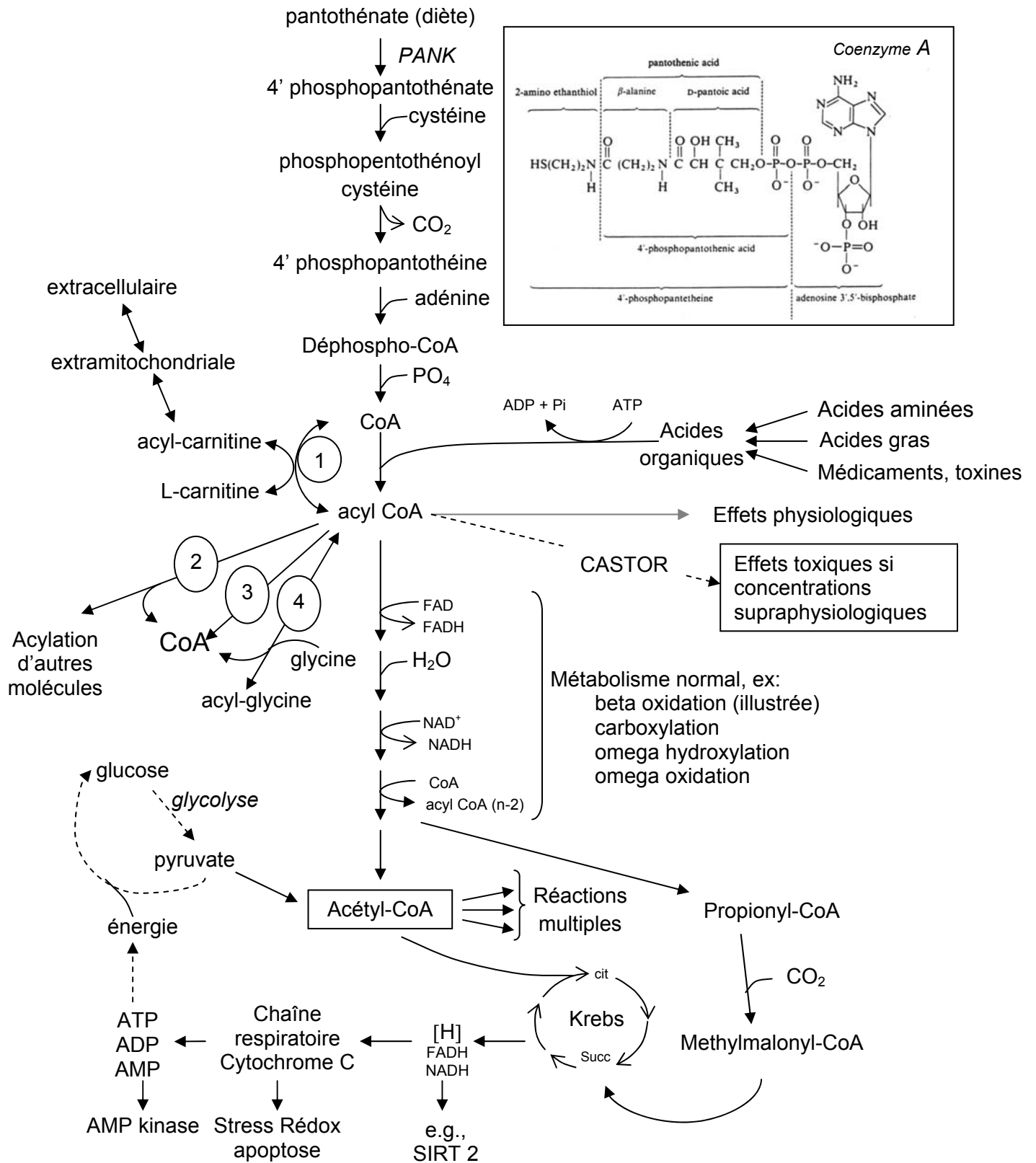


Figure 3 : Résumé du métabolisme du CoA. Quatre méthodes pour la libération du CoA à partir des acyls-CoA sont illustrées : 1, carnitine acyl transférase; 2, réaction d'acylation; 3, clivage par thioestérase; 4, glycine transférase. Des liens possibles à des voies métaboliques sont présentés au bas de la figure.

1.5 CASTOR

Le CoA est un cofacteur essentiel dans le métabolisme. Il permet aux acides organiques de participer aux réactions biochimiques sous la forme de thioesters. Plusieurs erreurs innées du métabolisme sont le fruit d'une déficience d'une enzyme impliquée dans le métabolisme des acyls-CoA et seront désignées EIMAC (erreurs innées du métabolisme de dégradation des acyls-CoA) pour la suite de cette thèse. Plusieurs de ces maladies présentent des signes très similaires malgré le fait que la déficience primaire affecte des voies métaboliques différentes. C'est avec cette observation en tête que nous avons regroupé ces maladies et proposé qu'une physiopathologie commune puisse expliquer ces signes. Étant donné le point commun de l'implication centrale du CoA dans ces maladies, nous avons émis l'hypothèse d'un phénomène de perturbation des niveaux de CoA et d'acyls-CoA que l'on a nommé sous l'acronyme *CASTOR* (*CoA Sequestration, Toxicity Or Redistribution*) (Figure 4) qui serait responsable de la physiopathologie de ces maladies (Mitchell et al., 2008). Des acyls-CoA en amont de la déficience enzymatique seraient accumulés. Nous pouvons présumer cette accumulation par le fait qu'il y a détection à des niveaux élevés des acides organiques urinaires liés à ces acyls-CoA et que le CoA et les acyls-CoA ne traversent pas la membrane mitochondriale librement. Il a été démontré précédemment que certains acyls-CoA peuvent avoir un effet inhibiteur sur des réactions importantes de voies métaboliques centrales et essentielles au métabolisme

telles que l'uréogénèse (MMA-CoA et propionyl-CoA inhibent la NAGS) et la néoglucogénèse (MMA-CoA inhibe la pyruvate carboxylase), d'où le terme toxique.

Comme mentionné précédemment, le niveau de CoA intracellulaire peut fluctuer, il demeure qu'il est plutôt stable et donc que la quantité de CoA libre est limitée. Or, une accumulation sévère d'acyls-CoA engendrerait une séquestration du CoA le rendant moins disponible pour les autres réactions du métabolisme où il est impliqué et nécessaire. Nous croyons que ces événements primaires initient une cascade qui culmine dans une maladie chronique et des décompensations aiguës que l'on observe chez ces patients (Figure 4 et 5). Jusqu'à maintenant, les maladies CASTOR ont été peu étudiées. Ceci est probablement dû à un manque de modèle pertinent, présentant des signes typiques du phénomène CASTOR. De plus, certaines données sur les niveaux intrahépatiques de différents acyls-CoA datent de plusieurs années et ont été obtenus à l'aide de méthodes peu fiables et dans certains cas les précautions pour éviter la dégradation des CoA ne sont pas décrites. Récemment, des techniques de détection d'acyls-CoA à chaînes courtes par HPLC (high pressure liquid chromatography) couplé à la spectrométrie de masse (MS) simple ou en tandem (Ms/Ms) ont permis d'avoir beaucoup plus de précision (Corkey et al., 1981; Gao et al., 2007; Palladino et al., 2012). Or, l'adaptation de cette technique à un modèle animal pertinent des maladies CASTOR n'a pas été réalisée à ce jour. Dans les prochains

paragraphe, je vais effectuer un bref résumé de quelques maladies CASTOR classiques ainsi qu'un survol des différents modèles animaux créés afin d'étudier ces maladies.

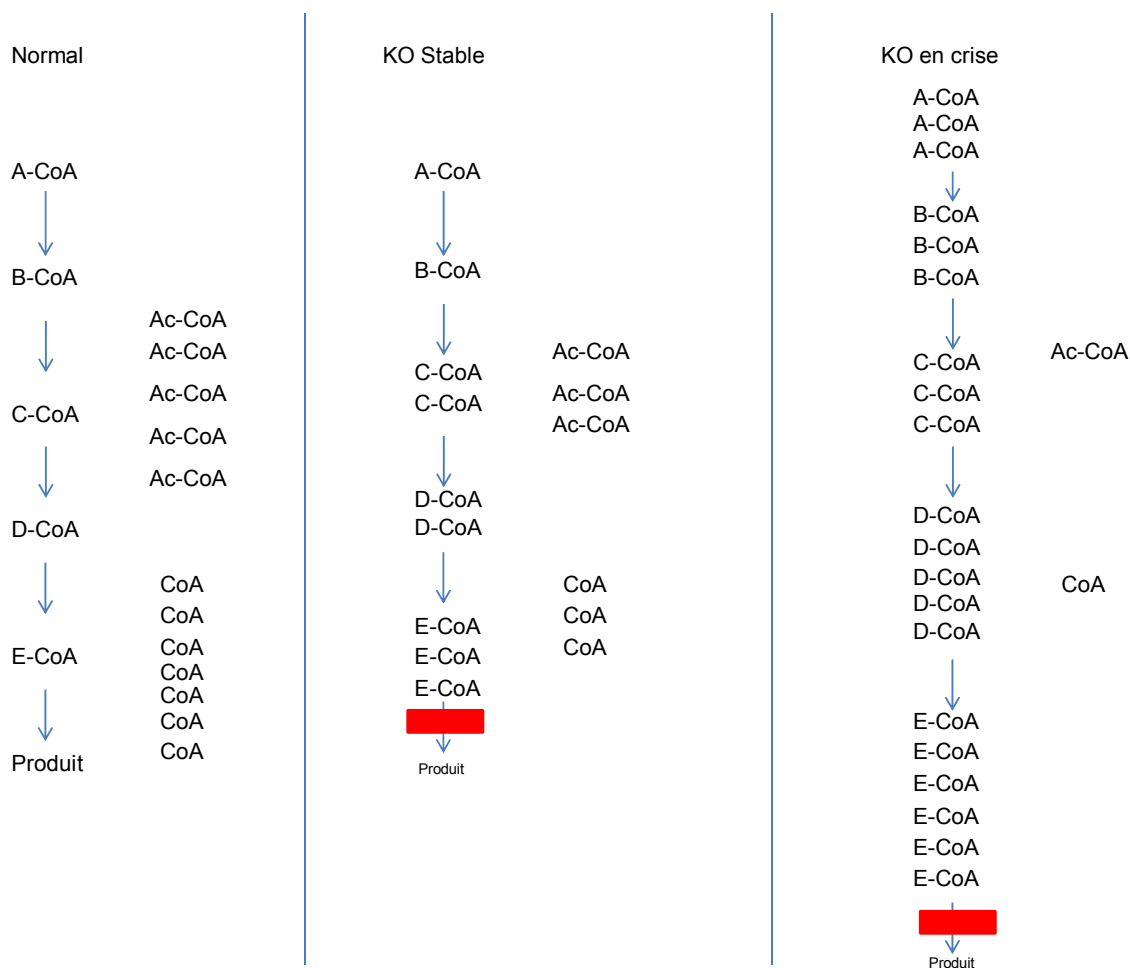


Figure 4 : Représentation schématique du phénomène CASTOR dans trois situations métaboliques. Le panneau de gauche présente une voie métabolique fictive avec plusieurs intermédiaires liés au CoA avec le produit final. Les pools intra-mitochondriaux d'acétyl-CoA et de CoA libre sont également représentés dans le schéma. Dans le panneau central, la même voie métabolique est présentée mais avec un blocage de la voie en amont du produit. Ainsi les intermédiaires CoA sont accumulés et les pools de CoA et d'acétyl-CoA sont diminués dû à la séquestration du CoA dans les

intermédiaires de la voie. Dans le panneau de droite, la même voie métabolique est représentée lors de période de crise. L'accumulation en amont de la déficience enzymatique serait plus sévère engendrant également une séquestration plus importante du CoA. Les pools de CoA libre et de l'acétyl-CoA seraient fortement diminués lors de cet état.

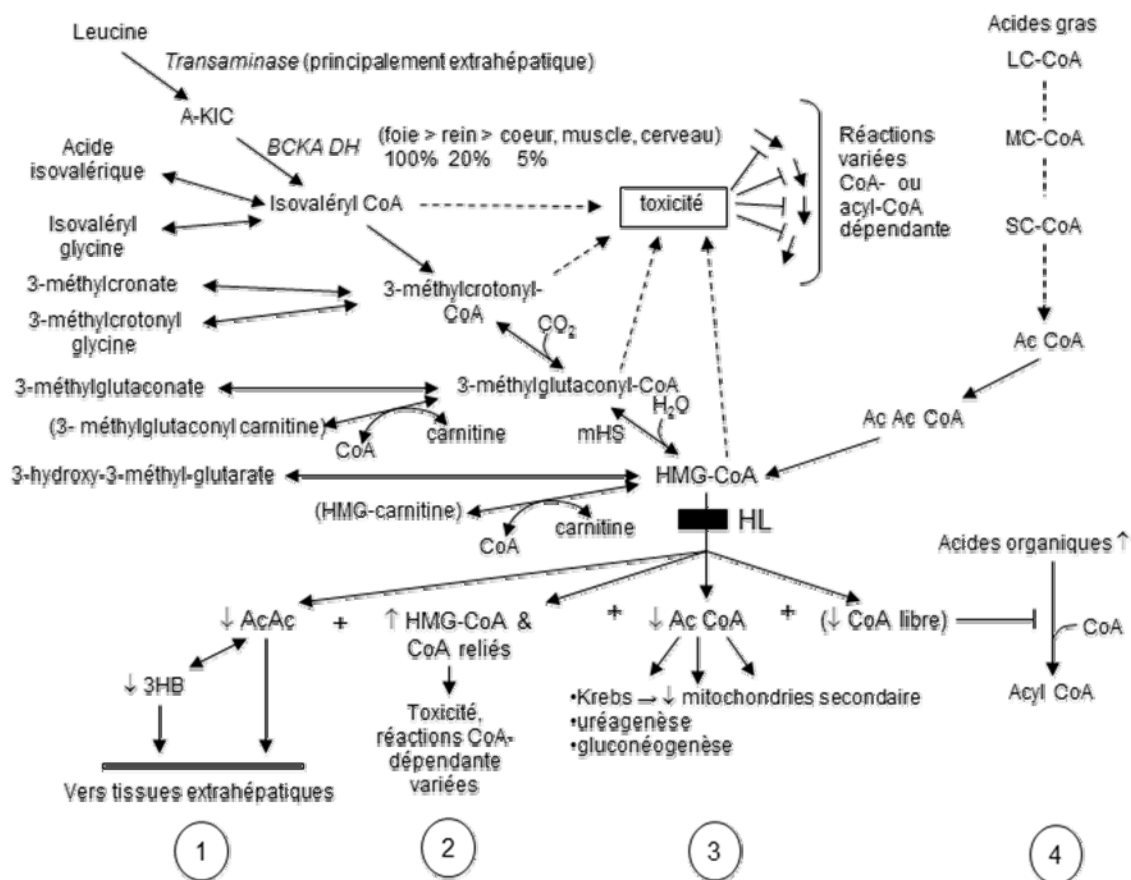


Figure 5 : Physiopathologie des maladies de type CASTOR, la déficience en HL comme exemple. L'activité tissu-spécifique, de la BCKADH est démontrée en % de l'activité retrouvée dans le foie (Wohlhueter and Harper, 1970). Au bas de la figure, quatre mécanismes potentiels de toxicité sont présentés pour la déficience en HL : (1) le manque de corps cétoniques pour les organes extrahépatiques, (2) l'augmentation toxique d'acyls-CoA spécifiques, (3) la diminution de la concentration d'acétyl-CoA et (4) la diminution du CoA libre.

1.6 Toxines responsables phénomène CASTOR

1.6.1 Hypoglycin A

Le phénomène CASTOR peut également être causé par l'ingestion d'un fruit appelé Ackee. Il a été déterminé que l'ingestion de ce fruit était la cause d'une maladie appelée le *Jamaican Vomiting Sickness* (JVS) qui présente des signes typiques du phénomène CASTOR, incluant des vomissements, de la somnolence, une hypoglycémie, le coma et le décès (Blake et al., 2006). Le Ackee est un fruit qui est important pour l'économie de la Jamaïque. La toxicité du Ackee provient de sa forte concentration en hypoglycin A. D'ailleurs, l'hypoglycin A serait en très forte concentration uniquement quand le fruit n'est pas mûr. La concentration diminuerait grandement lorsque le fruit arrive à maturité. Périodiquement, survient des épidémies de JVS, telles que celle observée au Burkina Faso en 1998 (Meda et al., 1999). Souvent, ces épidémies surviennent suite à une récolte diminuée secondaire à une catastrophe naturelle telle qu'une sécheresse ou une inondation. Afin d'expliquer ce lien, il a été émis comme hypothèse qu'afin de combattre la faim, les jeunes avaient tendance à cueillir les Ackee avant maturité et ainsi s'intoxiquer avec l'hypoglycin A présent en forte concentration dans le fruit qui n'est pas mûr. On peut spéculer que l'état de jeûne chez ces enfants agissait comme catalyseur dans le développement de l'effet CASTOR. Un métabolite de l'hypoglycin A, le méthylénecyclopropaneacetyl-CoA (MCPA-CoA) participe

également à la toxicité du Ackee. Ces deux composés sont des inhibiteurs de multiples acyl-CoA déshydrogénases dont l'isovaléryl-CoA déshydrogénase qui fait partie de la voie de dégradation de la leucine (Tanaka et al., 1971). Des études sur le rat ont permis de démontrer que le MCPA entraînait une perturbation des niveaux des acyls-CoA telle qu'une diminution du CoA libre et de l'acétyl-CoA et une augmentation générale des autres acyls-CoA dans des hépatocytes isolés (Lieu et al., 1997).

1.6.2 Valproyl-CoA

L'acide valproïque (VPA), un acide gras à chaîne moyenne, est largement utilisé comme médicament contre l'épilepsie (Luis et al., 2012). Les propriétés antiépileptiques du VPA ont été attribuées à son effet sur le neurotransmetteur gamma amino butyrate (GABA) et à l'inhibition de canaux ioniques. Le VPA a également été reconnu comme un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC) (Silva et al., 2008). Il y a eu plusieurs cas répertoriés de décompensation suite à la prise de VPA (Powell-Jackson et al., 1984). Ces décompensations présentent des signes similaires aux maladies CASTOR (Silva et al., 2008).

1.6.3 Hopantenate

Le hopantenate (hopan) est un composant d'un médicament stimulant la fonction cérébrale utilisé au Japon (Otsuka et al., 1990). Or, plusieurs cas de décompensation avec des signes liés au syndrome de Reye (caractérisé par une encéphalopathie et une dégénération hépatique avec stéatose) (Reye et al., 1963) ont été documentés dans la littérature suite à l'exposition au Hopan (Nakanishi et al., 1990; Noda et al., 1991; Noda et al., 1988; Otsuka et al., 1990; Sasaki et al., 1991). Une étude intéressante a été publiée dans laquelle les auteurs ont administré le Hopan à des souris (Zhang et al., 2007b). L'Hopan est un compétiteur non-métabolisable du pantothénate pour la réaction de PANK, première étape de production du coenzyme A. L'administration du Hopan chez la souris produit des signes semblables aux intoxications observées chez l'humain tel que l'hypoglycémie. Les souris traitées ayant reçu le Hopan décèdent quelques jours après l'administration. Les mâles décèdent plus rapidement que les femelles (5 vs 15 jours). L'administration de la même quantité de pantothénate que d'Hopan empêchait le décès de la souris. La concentration de CoA total est diminuée dans le foie des souris mâles traitées avec Hopan bien que la diminution provienne majoritairement du CoA libre. Les acyls-CoA à chaînes courtes et longues ne sont pas diminués de façon significative. Il est intéressant de constater que les niveaux de CoA libre sont fortement diminués dans le foie et les reins alors que le niveau dans le cerveau et le cœur est demeuré constant. Une sévère hypoglycémie est observée chez les souris traitées au Hopan. Une capacité

réduite de la néoglucogenèse a également été observée : la réponse hyperglycémiant normale à la suite à d'un test de tolérance au pyruvate n'a pas été détectée chez ces souris. (Zhang et al., 2007b).

1.7 Modèles animaux

Plusieurs modèles animaux ont été créés afin d'étudier la voie de la β -oxydation des acides gras. Ces modèles présentent sensiblement les mêmes phénotypes soit une légère hypoglycémie, une intolérance au froid et une stéatose hépatique légère. Voici quelques modèles animaux des EIMAC.

1.7.1 CPT

La déficience génique des sous unités de CPT-1 a (foie) et b (muscle) sont tous les deux létales chez la souris (Ji et al., 2008; Nyman et al., 2005).

La souris déficiente en CPT-1c (cerveau) a un poids corporel et une consommation d'aliments plus faible mais est plus susceptible de développer de l'obésité lorsque nourrie avec une diète riche en gras (Wolfgang et al., 2006).

1.7.2 VLCAD

Les souris déficientes en VLCAD sont asymptomatiques, mais développent une hypoglycémie, une accumulation d'acyl-carnitine à chaînes longues et une myopathie lorsqu'elles sont soumises à un stress tel qu'un jeûne, de l'exercice physique ou une exposition au froid (Tucci et al., 2010).

1.7.3 LCAD

Malgré le fait qu'il n'y ait pas de cas connu dans la littérature de déficience humaine en LCAD, la souris invalidée a été créée (Kurtz et al., 1998). Elle présente des signes semblables à la déficience humaine en VLCAD. Elle présente une intolérance au froid et au jeûne (Guerra et al., 1998). De plus, il y a des pertes gestationnelles ainsi que des morts subites. Les souris déficientes en LCAD présentent un changement des niveaux de lipides dans le cœur et le foie et développent une hypoglycémie avec hypocétose (Zhang et al., 2007a).

1.7.4 MCAD

La souris déficiente en MCAD a été créée. Elle présente de nombreuses caractéristiques semblables aux patients déficients en MCAD.

Tout d'abord, elle démontre des changements biochimiques typiques de la déficience en MCAD dans le sang et les urines (accumulation d'acide adipique, subarique et sébacique et d'hexanoylglycine dans l'urine ainsi qu'une accumulation de decenoylcarnitine dans le sérum et la bile après un jeûne de 18 h). De plus, ces souris présentent une intolérance au froid et développent une hypothermie sévère et une hypoglycémie. Elles vont également développer une hypoglycémie et une stéatose hépatique suite à un jeûne de 24h (Tolwani et al., 2005) Des lésions cardiaques (cardiomyopathie) ont été observées de façon sporadique chez les souris déficientes en MCAD.

1.7.5 SCAD

Il a été découvert en 1989 que la souche de souris BALB/cByJ était naturellement déficiente en SCAD (Wood et al., 1989). Comme les humains déficients en SCAD, la souris est plutôt asymptomatique. Elle présente une excrétion d'acides urinaires augmentés d'acide méthylsuccinique et éthylmalonique ainsi qu'une accumulation de butyrylglycine. Une intolérance au froid et une hypoglycémie liée au jeûne ont été rapportées dans la littérature (Guerra et al., 1998; Wood et al., 1989). La souris déficiente en SCAD a été étudiée dans l'article que je présente au chapitre 5.

1.7.6 Mitochondrial Trifunctional Protein

L'invalidation du gène de la *Mitochondrial Trifunctional Protein* (MTP) chez la souris est létale dans la période néonatale. Comme plusieurs autres modèles cités précédemment, elle présente une stéatose hépatique, une nécrose des myocytes et de l'hypoglycémie (Schuler and Wood, 2002).

1.7.7 M/SCHAD

Il existe une souris dont le gène de M/SCHAD a été invalidé. Comme plusieurs modèles de la β -oxydation des acides gras, elle présente une intolérance au froid et au jeûne (Schuler and Wood, 2002). Récemment, la concentration de nombreux acyls-CoA hépatique suite à un jeûne de 24h a été réalisée sur la souris avec une invalidation génique en SCHAD. Les résultats obtenues présentent une diminution significative de la concentration de C2-CoA ainsi qu'une augmentation significative de C6-, 3-OH-C6, C8:1-, C8- et C8-DC-CoA en comparaison à une souris témoin (Palladino et al., 2012).

1.7.8 Déficience en biotinidase

Une souris déficiente en biotinidase a été créée. Ces souris n'ont aucune activité biotinidase détectable et développent des signes typiques de la déficience profonde en biotinidase. Lorsque nourries avec une diète déficiente en biotine, ces souris développent des signes cutanés et neurologiques, une déficience enzymatique de nombreuses carboxylases, une hyperammoniémie légère et démontrent une excrétion urinaire augmentée d'acide 3-hydroxyisovalérique, de biotine et des métabolites de la biotine. La supplémentation en biotine permet de renverser les signes cliniques (Pindolia et al., 2011).

1.7.9 Méthylmalonyl-CoA mutase

La souris déficiente en méthylmalonyl-CoA mutase possède des mégamitochondries (mitochondries de taille anormalement grosses) et présente des dysfonctions de la chaîne respiratoire mitochondriale telles qu'une diminution de l'activité du complexe I + II ainsi que du complexe II + III et du complexe IV (Chandler et al., 2009).

1.8 Hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A lyase (HL)

Dans la dernière réaction enzymatique de la cétogenèse, le HMG-CoA est clivé par l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl Coenzyme A lyase (HL) et produit l'acétyl-CoA et l'AcAc qui peut être converti en 3HB par l'enzyme 3-hydroxybutyrate déshydrogénase. Le HMG-CoA est le point de convergence de la voie de la β -oxydation des acides gras et de la voie de dégradation de la leucine (figure 5).

L'enzyme HL (HL, EC 4.1.3.4) (Mitchell, 2001) est un homodimère dont le précurseur de 325 résidus est clivé pour atteindre sa forme mature de 298 résidus.

Le promoteur du gène d'HL de souris contient un îlot CpG et plusieurs motifs de liaisons Sp1, mais ne contient aucune boîte TATA ou CAAT. Il y a plusieurs sites de départ de transcription à 9 – 35 bases en amont du codon du signal de départ (Wang et al., 1996). HL est exprimé dans tous les tissus étudiés à ce jour, donc l'expression serait ubiquitaire. Une légère augmentation de l'activité est observée dans le foie de rats à jeun et nourris avec une diète riche en acides gras (Williamson et al., 1968) alors que l'activité peut quadrupler durant la transition foeto-néonatale.

L'ADNc d'HL a tout d'abord été cloné dans la bactérie *Pseudomonas mevalonii* pour ensuite être cloné dans le foie humain, de souris et de rat (Mitchell, 2001). Tous les tissus humains étudiés à ce jour contiennent un ARNm d'HL d'environ 1,7 kb. Le gène d'HL a été cloné chez l'humain et la souris. Chez la souris, le locus du gène d'HL, *Hmgcl*, est situé sur le chromosome 4, dans une région homologue au locus humain, *HMGCL*, situé sur le chromosome humain 1p35.1-36.1. Chez la souris, le gène d'HL contient 9 exons et possède une longueur d'environ 15 à 20 kb. Les exons 2 à 9 sont représentés de façon similaire chez la souris. Le signal d'entrée mitochondrial est situé sur les exons 1 (20 codons) et 2 (8 codons). Une région hautement conservée, incluant les codons pour les résidus catalytiques essentiels, l'arginine 41 et l'acide aspartique 42, est encodée par l'exon 2, tandis que les résidus essentiels histidine 233 et 235 (*cation binding*) sont situés au niveau de l'exon 7. Le codon cystéine 266 du site actif est au niveau de l'exon 8 alors que le signal d'entrée peroxisomal et le codon du signal d'arrêt de la traduction sont dans l'exon 9 (Wang et al., 1996).

HMG-CoA est également impliqué dans la voie de la production du cholestérol telle que présentée à la figure 6. D'ailleurs, les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase, prescrits dans le contrôle du taux de cholestérol, sont parmi les médicaments les plus vendus (Buemi et al., 2007). Or, bien que

l'HMG-CoA soit présent dans les deux voies, la production du cholestérol est une réaction cytoplasmique alors que la céto-genèse est mitochondriale. Puisque les acyls-CoA ne peuvent pas traverser librement la membrane mitochondriale, il n'y aurait aucun lien entre les deux voies. Les groupements acyls, pour traverser la membrane mitochondriale, doivent se lier à la carnitine afin de passer par le système de navette lié aux CPT. D'ailleurs, le niveau de cholestérol chez les patients déficients en HL serait normal, selon une observation clinique (Dr. Grant Mitchell, donnée non-publiée). Notre modèle murin va permettre de vérifier cette indépendance entre la voie de la céto-genèse et de la production du cholestérol.

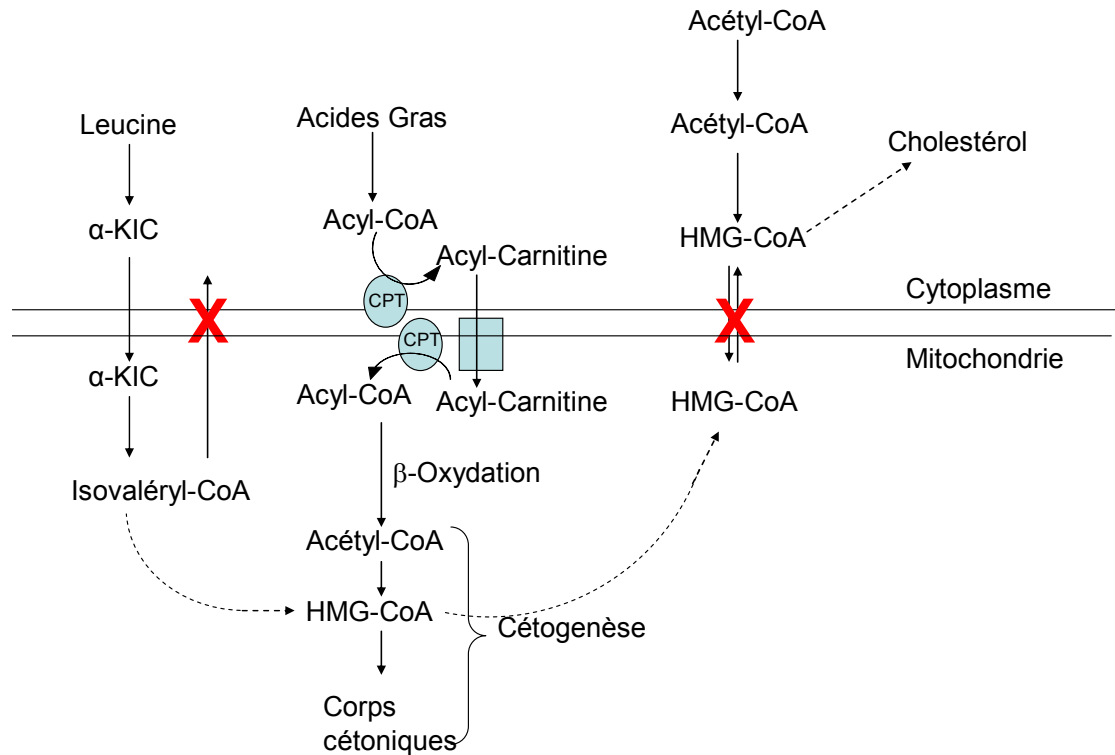


Figure 6 : Compartimentation des voies de la cétogenèse et de la production du cholestérol. Les acyls-CoA ne peuvent pas traverser la membrane mitochondriale. Les X rouges indiquent l'impossibilité des acyls-CoA à franchir librement la membrane mitochondriale et ainsi démontre l'indépendance des pools d'HMG-CoA mitochondriale et cytosolique. Ainsi une augmentation mitochondriale d'HMG-CoA n'a pas d'impact sur le niveau cytosolique d'HMG-CoA.

HL effectue une réaction Claisen inverse en trois étapes (Mitchell, 2001). Tout d'abord, l'enzyme enlève un proton du groupement 3-hydroxyl du HMG-CoA par un résidu au site actif servant de base générale. Ensuite,

l'enzyme scinde le lien C2-C3 et produit de l'AcAc et un carbanion-CoA. Finalement, il y a une neutralisation du carbanion-CoA par un acide général du site actif pour créer l'acétyl-CoA. Dans son ensemble, la réaction est irréversible, bien que la dernière étape d'enolisation de l'acétyl CoA peut, dans une certaine mesure être réversible. La cystéine en position 266 dans l'HL humain est un résidu du site actif, probablement le récepteur de la première étape de la réaction lorsque HMG-CoA se lie à HL. D'autres résidus ont une implication directe dans la catalyse par HL. Grâce à des mutants naturels et synthétiques, des études ont démontré que l'histidine 233, l'arginine 41 et l'acide aspartique 42 sont également essentiels à la catalyse alors que l'histidine 235 est impliqué dans la liaison au métal. L'enzyme HL humaine présente un K_m de 21,2 μM , une V_{max} de 159 unités/mg de protéine et un taux de renouvellement de 158 s^{-1} à un pH de 8,2 et 30°C pour HMG-CoA (Kramer and Mizioroko, 1980). HL est spécifique pour le diastéréoisomère (S) d'HMG-CoA alors que la forme (R)-HMG-CoA (non-physiologique) n'est ni un substrat ni un inhibiteur de la réaction. La réaction d'HL requiert la présence de cations divalents. Le K_m pour Mg^{++} est 233 μM alors qu'il est de 1,5 μM pour Mn^{++} , avec une constante d'activation (K_a) de 0,5 μM . Le pH optimal d'HL est d'environ 9,2. Celui-ci augmente son potentiel catalytique dans la matrice mitochondriale puisque le pH y est d'environ 0,5 unité supérieur à celui rencontré dans le cytoplasme (Strzelecki et al., 1984).

La localisation d'HL est majoritairement mitochondriale, mais il existe un signal d'entrée peroxysomale sous forme d'un tripeptide, Cys-Lys-Leu, à l'extrémité C-terminale d'HL humain (Mitchell, 2001). Environ 6% d'HL du foie humain et de la souris est peroxysomal. Ce taux est de 16 à 20% dans les fibroblastes et lymphoblastes humains ainsi que dans les cellules Hep G2. HL peroxysomal possède un pI plus basique (7,6 vs 6,2) ainsi qu'une masse supérieure à la protéine mitochondriale mature (34,5 kDa vs 32 kDa). Cette différence de masse suggère que le signal d'entrée mitochondrial reste présent chez la protéine peroxysomale alors qu'il est retiré lors de l'entrée d'HL dans la mitochondrie. Le précurseur d'HL recombinant est enzymatiquement actif, aux mêmes Km, Vmax et pH optimal pour HMG-CoA que ceux pour l'HL naturel (Mitchell, 2001). Des études métaboliques ont permis de montrer une demi-vie de 13,5 à 19 heures pour HL mitochondrial et de 12 à 16 heures pour HL peroxysomal dans des cellules Hep G2, des fibroblastes et des lymphoblastes (Ashmarina et al., 1999).

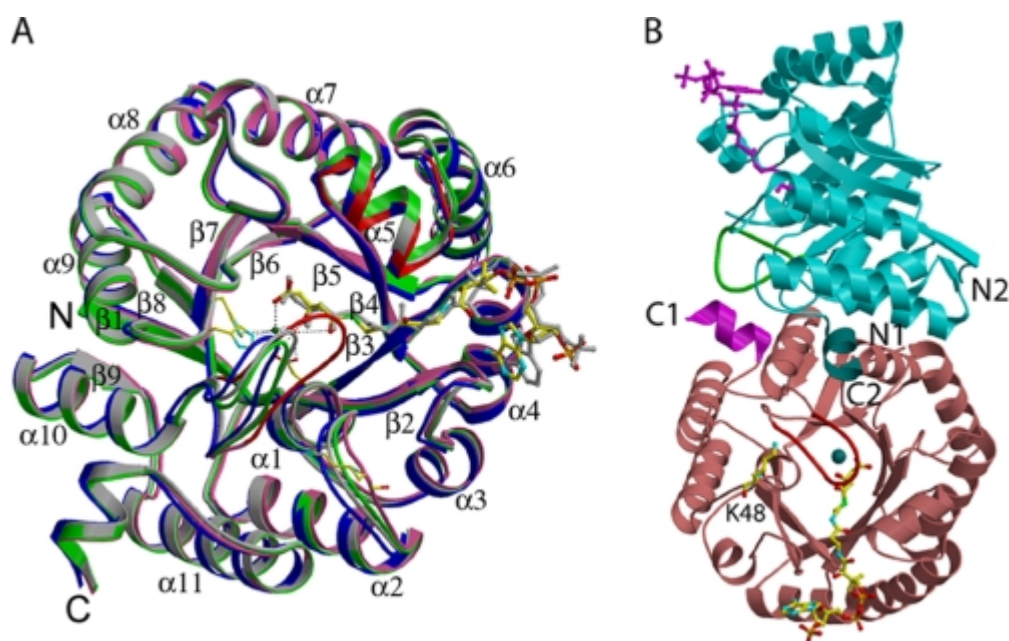


Figure 7 : Diagramme en ruban de la structure d'HL humain. Une superposition de 4 structures est représenté. Gris clair, lyase WT; bleu, lyase WT avec l'inhibiteur HG-CoA; vert, R41M; rose, R41M-HMG-CoA. Tiré de (Fu et al., 2010)

La structure cristallographique (Figure 7) a été déterminé (Fu et al., 2010). Afin de mieux comprendre la base moléculaire et l'impact d'une mutation fréquente sur l'enzyme HL, le groupe a réalisé deux cristaux. Le premier a été effectué à partir de l'enzyme de type sauvage avec l'inhibiteur compétitif 3-hydroxyglutaryl-CoA alors que le deuxième cristal a été effectué avec le mutant R41M couplé au substrat naturel, HMG-CoA. La mutation R41M est située sur l'exon 2, site du plus grand nombre de mutations répertoriées chez les cas connus de déficience en HL (Figure 8 et tableau I).

L'arginine 41 est également le site de la majorité des mutations répertoriées. Les deux cristaux ont été résolus à 2,4 et 2,2 Å respectivement. Ils ont démontré l'importance de l'arginine en position 41 qui est impliqué dans la liaison de l'acyl-CoA. Ceci explique la raison pour laquelle la mutation cause une déficience enzymatique drastique.

Récemment, un groupe a identifié et caractérisé une enzyme HL extramitochondriale (Montgomery et al., 2012). Ils ont démontré que HMG-CoA lyase-like protein (HMGCLL1) possède une activité catalytique comparable au HL humain pour cliver HMG-CoA vers l'AcAc et acétyl-CoA. HMGCLL1 pourrait avoir un rôle dans la biosynthèse des lipides ou dans le métabolisme énergétique des tissus cancéreux.

1.9 Déficience humaine en HL

La déficience humaine en HL a été décrite pour la première fois en 1976 (Faull et al., 1976). La déficience en HL est une maladie de type CASTOR (Figure 5) qui est caractérisée par des crises d'hypoglycémie et d'acidose sans cétose durant lesquelles, le système nerveux central est particulièrement vulnérable. Ces crises peuvent causer des handicaps permanents sévères pour le patient tels que le retard mental. Les risques de

retard mental et d'épilepsie dans la déficience en HL dépassent ceux observés dans d'autres conditions présentant des hypoglycémies semblables au niveau de la longueur et de la sévérité. La déficience en HL est habituellement bien tolérée lorsque le patient n'est pas en crise. Lors de l'analyse de 62 cas de patients déficients en HL reportée, 30 d'entre eux ont consulté dans les premières semaines de vie (Mitchell, 2001). La plupart des autres patients atteints se sont présentés avant l'âge d'un an et rarement après l'âge de deux ans. Habituellement, la grossesse et l'accouchement se déroulent normalement. Les épisodes de crises suivent habituellement un jeûne, une infection, un repas élevé en protéines et la transition fœtale – néonatale. Les patients vont présenter durant les crises une hypoglycémie et une baisse du pH modérée à sévère, pouvant aller jusqu'à une concentration de glucose sanguin indétectable, un pH < 7,0 (normal 7,2 – 7,4) et un niveau de bicarbonate < 6,0 mM (normal 21-26). Des vomissements, une léthargie, de la tachypnée et une hépatomégalie modérée avec une élévation des transaminases sériques sont fréquemment rencontrés. L'hyperammoniémie a été rapportée et peut être sévère, soit > 1000 μ M (normal < 40) (Stacey et al., 1985). L'urine des patients peut dégager une odeur particulière, probablement due à la présence de l'acide 3-méthylcrotonique. (Sweetman, 2001)

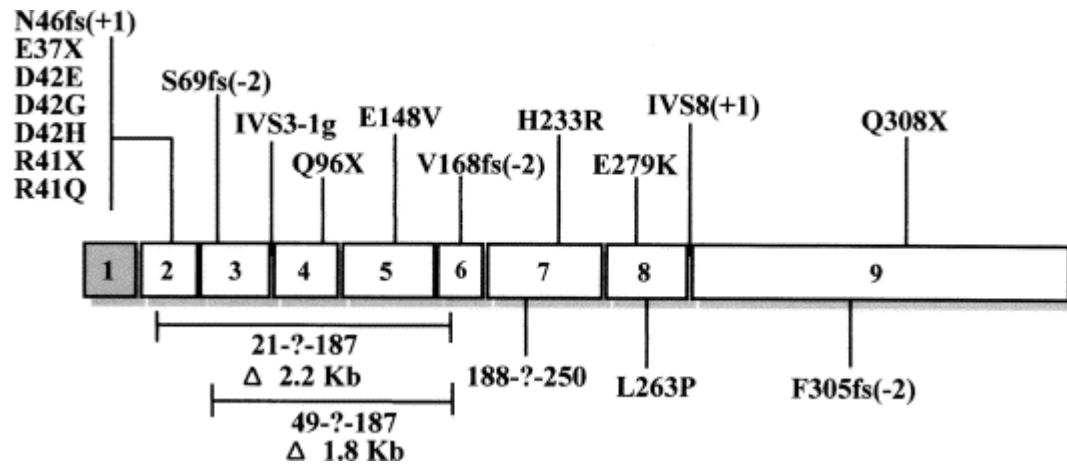


Figure 8 : Représentation schématique de mutations présentement identifiées dans le gène HMGCL humain. (Cardoso et al., 2004)

Tableau I : Mutations dans le gène *HMGCL*. (Cardoso et al., 2004).

| Number of cases | Mutation | Codon change | Exon/intron | cDNA position | Comments mRNA/protein | Ethnic origin |
|-----------------|------------|---------------------|-------------|-----------------|--|----------------------------|
| 1 | E37X | Glu 37 > stop | E2 | G 109 > T | Partial skipping | Portuguese |
| 1 | | | | | Exon 2/3 | Moroccan |
| 3 | | | | | Truncated protein | Spanish |
| 1 | | | | | | Turkish |
| 2 | N46fs(+1) | Asn 46 > Lys | E2 | 137 ^ 138 ins A | Frameshift/premature stop codon 47 | Italian |
| 6 | R41Q | Arg 41 > Gln | E2 | G122 > A | Missense | Saudi Arabian |
| 1 | | | | | | Turkish |
| 1 | | | | | | Italian (het) |
| 1 | R41X | Arg 41 > stop | E2 | C121 > T | Stop codon | English (het) |
| 1 | D42H | Asp 42 > His | E2 | G124 > C | Missense | Cajun Black (het) |
| 1 | D42G | Asp 42 > Gly | E2 | A125 > G | Missense | German |
| 1 | D42E | Asp 42 > Glu | E2 | T126 > G | Missense | Austrian |
| 1 | 21-?-187 | Val 21del | E2,3,4,5,6 | 61-561del | Deletion between Val21-Glu187 | Turkish |
| 2 | S69fs(-2) | Ser 69 > Cys | E3 | 202-207del CT | Frameshift/premature stop codon 79 | French-Canadian (Quebeque) |
| 1 | 49-?-187 | Asn 49del | E3,4,5,6 | 145-561del | Deletion between Asn49/Glu187 | Italian |
| 1 | IVS3-1g | Asn 49-Gln 84 del | I3 | 252delG | Skipping exon 3 | Japanese |
| 1 | Q96X | Gln 96 > stop | E4 | C286 > T | Stop codon/Truncated protein | Italian |
| 1 | E148V | Gln148-Glu187 del | E5 | A434 > T | Del Gln148-Glu187 Aberrant <i>splicing</i> partial E5 and total E6 | Japanese (het) |
| 1 | V168fs(-2) | Val 168 > Val | E6 | 504-505del CT | Frameshift/premature stop codon 176 | Spanish |
| 2 | H233R | His 233 > Arg | E7 | A698 > G | Loss active catalytic site | English French [het] [s] |
| 1 | 188-?-250 | Val 188-Gln 250 del | E7 | 564-750del | Deletion exon 7 | Japanese |
| 1 | E279K | Gln 279 > Lys | E8 | G835 > A | Missense | Japanese |
| 1 | L263P | Leu 263 > Pro | E8 | T788 > C | Missense | French [het] [s] |
| 1 | IVS8(+1) | | I8 | AGgt > AGtt | Aberrant splicing | Turkish |
| 2 | F305fs(-2) | Phe 305 > Tyr | E9 | 914-915del TT | Premature stop codon | Saudi Arabian |
| 1 | Q308X | Gln 308 > stop | E9 | C922 > T | Stop codon (del 18 amino acids) | Japanese |

Plusieurs patients présentent des anomalies de la matière blanche cérébrale, plus précisément au niveau des fibres arquées profondes, qui vont être de faible densité en tomographie axiale et de haute intensité en imagerie par RMN-T2 (Mitchell, 2001). Une macrocéphalie a été rapportée chez certains patients déficients en HL présentant des complications neurologiques sévères. Une macrocéphalie augmenterait la consommation cérébrale de glucose, ce qui accélérerait le développement d'une hypoglycémie. Des cas de cardiomyopathie (Gibson et al., 1994), de pancréatite (Wilson et al., 1984),

de surdité non-évolutive et de rétinite pigmentaire (Jones et al., 1997) ont été rapportés chez des patients déficients en HL. Des complications similaires sont retrouvées dans d'autres acidémies organiques alors il est peu probable qu'il s'agisse de coïncidences. De plus, une stéatose hépatique peut être observée chez ces patients. Une biopsie du cerveau chez un patient a démontré une gliose, une spongiose et une augmentation du contenu en glycogène des astrocytes (Mitchell, 2001).

Les patients déficients en HL présentent un patron distinctif d'acides organiques urinaires provenant des derniers métabolites de dégradation de la leucine, soit entre autres, l'acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique, l'acide 3-méthylglutaconique et l'acide 3-hydroxyisovalérique (Sweetman, 2001). Bien que le patron observé soit caractéristique de la maladie, le diagnostic ne peut se baser uniquement sur les acides organiques puisque de rares cas ont présenté ce patron tout en ayant une activité d'HL normale (Jones and Chalmers, 2000; Pie et al., 2007). Donc, afin de confirmer le diagnostic de d fici nce en HL, un test enzymatique doit être réalisé dans les fibroblastes.

Plusieurs mutations peuvent être responsables de la d fici nce en HL et celles-ci sont distribuées dans tous les exons (Tableau I). Les mutations pathogènes sont concentrées dans l'exon 2 (Figure 8). Il a été démontré que l'exon 2 contient plusieurs résidus du site actif (Forouhar et al., 2006). Cette

haute concentration de mutations dans l'exon 2 fait de ce site une cible de choix pour la création d'un modèle murin de la maladie.

1.10 Implication du laboratoire

Le laboratoire est impliqué depuis de nombreuses années dans le domaine de l'étude du métabolisme énergétique des lipides dont les corps cétoniques. Le laboratoire a effectué le clonage des 2 gènes principaux de la céto-genèse, soit HL et mHS (Boukaftane et al., 1994; Boukaftane and Mitchell, 1997) ainsi que SCOT (Kassovska-Bratinova et al., 1996) impliqué dans la céto-lyse. Le laboratoire a également rapporté la première mutation dans chacun de ces gènes (Bouchard et al., 2001; Kassovska-Bratinova et al., 1996). C'est notre laboratoire qui a démontré le double ciblage (mitochondrie et peroxysome) d'HL (Ashmarina et al., 1994). Nous avons décrit plusieurs mutations dans la région de l'exon 2, y compris la mutation fondatrice retrouvée en Arabie Saoudite (Mitchell et al., 1998). Ces mutations inactivent complètement l'enzyme. À cause de cette observation, un collaborateur H. Miziorko, a démontré que plusieurs résidus mutés à l'exon 2 font partie du site actif (Tuinstra et al., 2004).

1.11 Mise en contexte et contribution de l'étudiant

L'article présenté au chapitre 2 complète l'introduction de la thèse. Il inclut une revue de la littérature des maladies liées au CoA comme mise en contexte pour la présentation de notre hypothèse CASTOR. Je suis le deuxième auteur sur cet article. Mes premières observations d'un profil anormal des acyl-CoA chez les souris HLLKO, quoique préliminaires, ont été importantes dans la décision de parfaire et de soumettre cet article. Ces observations nous laissaient croire que le phénomène CASTOR existait. Au cours de l'écriture de cet article, nos idées du phénomène CASTOR se sont raffinées et cela a permis à mon patron et moi d'élaborer la série d'hypothèses énumérées à la section suivante et que nous avons tenté d'explorer dans les travaux subséquents.

L'article présenté au chapitre 3 représente la majeure partie de mes travaux. Nous avons toujours vu cet article comme une histoire qui parviendrait à joindre la déficience enzymatique aux signes que j'observais chez la souris HLLKO. Ce projet a nécessité le développement de nombreuses techniques, la plus importante étant la quantification des acyls-CoA hépatiques par HPLC-MS/MS.

La souris HLLKO a été créée par le Dr Shupeï Wang au laboratoire. L'analyse des acides organiques urinaires a été réalisée par le Dr Pierre Allard. L'analyse des acyls-carnitines dans le sang a été réalisée par le Dr Lawrence Sweetman. L'analyse des marqueurs circulants des péroxisomes a été réalisée par l'équipe du Dre Ann Moser. Professeur Orval Mamer a synthétisé le D₃-acétyl-CoA et a supervisé les premiers dosages pilotes des acyls-CoA ayant démontré le phénomène CASTOR pour la première fois. Tous les autres résultats présentés dans cette thèse ont été réalisés par moi. Ceci implique, entre autres, la gestion de la colonie animale, la récolte de tissus, de sang et d'urine, la mise au point des expériences incluant l'isolement des hépatocytes, l'évaluation du flux de différentes voies métaboliques, la quantification des acyls-CoA par spectrométrie de masse et de la mise sur pied du test d'efficacité du carglumate. J'ai également effectué toutes les expériences pour récolter les données et j'ai effectué l'analyse de celles-ci. Je tiens à remercier particulièrement le Dr François Lépine ainsi que son technicien, Sylvain Milot, pour le partage de leur expérience en spectrométrie de masse et leur aide pour la mise au point de la technique de détection des acyls-CoA. La majorité de mes travaux doctoraux ont porté sur l'étude de la souris HLLKO.

L'article présenté au chapitre 4 a permis de démontrer la présence d'un phénomène CASTOR dans un deuxième modèle animal. La souris SCADD est disponible commercialement. J'ai effectué toutes les techniques menant

aux résultats présentés dans l'article. La pertinence de cet article est principalement dans le fait qu'il vient démontrer que le phénomène CASTOR n'est pas exclusif à la déficience en HL. Cette observation vient renforcer notre hypothèse d'un phénomène CASTOR commun à de nombreuses maladies métaboliques affectant les acyls-CoA. L'étude de la déficience en SCAD n'a pas été le sujet central de mes travaux doctoraux.

Dans l'annexe, je présente brièvement les travaux effectués sur la souris HLHKO chez lesquelles HL est invalidé sélectivement dans le cœur.

1.12 Objectif et Hypothèses du projet

L'objectif global de ce projet est de comprendre la physiopathologie des maladies liées aux CoA afin de mieux traiter ces patients. L'hypothèse principale est que la physiopathologie de ces maladies est causée par un phénomène CASTOR qui enclenche un bouleversement du métabolisme énergétique.

1.12.1 Hypothèse secondaires :

Plusieurs hypothèses découlent des réflexions aux niveau biochimiques cellulaires et physiopathologique sur le rôle métabolique du CoA.

1- Dans les maladies héréditaires de la dégradation des acyls-CoA, il y a un profil anormal et distinct des acyls-CoA (L'hypothèse d'un phénomène CASTOR).

2- La relation entre le profil d'accumulation des acides organiques urinaires et des acyl-carnitines plasmatiques et l'accumulation des acyls-CoA intracellulaires est différent pour chaque acyl-CoA.

3- Un élément commun aux EIMAC est la diminution de la disponibilité de l'acétyl-CoA et du CoA libre; en combinaison avec l'accumulation d'acyls-CoA, ceci est toxique.

4- Le phénomène CASTOR primaire mène à une inhibition des grandes voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, l'uréogénèse et l'état oxydo-réducteur mitochondrial, ce qui déclenche les signes typiques de ce groupe de maladies. Le phénomène CASTOR engendre l'activation de voies de détoxification non-physiologiques ou l'insuffisance de produits en aval de la voie métabolique affectée.

5- Le CoA et l'acétyl-CoA servent de signaux métaboliques dans la physiologie cellulaire et ont une influence différente que dans leur rôle traditionnel d'intermédiaire du métabolisme énergétique.

6-Deux états cliniques distincts peuvent être présents dans les maladies CASTOR : aigu (crise métabolique qui nécessite une intervention médicale immédiate afin d'entretenir la vie) et chronique (patient stable).

7- L'intensité de la perturbation des niveaux des acyls-CoA (phénomène CASTOR) et la présence d'un seuil critique entraînant la crise explique le développement de signes et complications sévères chez certains patients alors que d'autres présentent un état clinique tout à fait normal.

8- Dans les conditions CASTOR, l'accumulation des acyls-CoA et ses conséquences peuvent survenir quel que soit l'état des cellules environnantes. (hypothèse de l'autonomie cellulaire)

9- Le foie est touché dans une haute proportion des maladies CASTOR étant donné son importance centrale dans le métabolisme énergétique et la dégradation des acides aminés.

10- Les manifestations extra-hépatiques sont spécifiques à chaque pathologie à l'opposé à ceux hépatiques qui sont davantage similaires parmi les différentes EIMAC.

11- Certains traitements pourraient directement influencer l'accumulation des acyls-CoA.

**Chapitre 2 : Hereditary and acquired diseases of acyl-coenzyme A
metabolism**

Publié dans Molecular Genetics and Metabolism

Title: Hereditary and Acquired Diseases of Acyl-Coenzyme A Metabolism

Grant A Mitchell¹, Nicolas Gauthier¹, Alain Lesimple², Shu Pei Wang¹, Orval Mamer², Ijaz Qureshi¹

¹ Division of Medical Genetics, CHU Sainte-Justine, Montréal, CANADA

² McGill University Mass Spectrometry Unit, Montréal, CANADA

Corresponding author: Grant A Mitchell, Division of Medical Genetics, CHU Sainte-Justine,
3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Canada H1R 2A6.
Telephone : 514 345 4727
Fax : 514 345 4766

Abbreviations: ACBP, acyl-CoA binding protein; BCAA, branched chain amino acids; CASTOR, Coenzyme A (CoA) sequestration, toxicity or redistribution; CoA, Coenzyme A; CoASH, free CoA; FA, fatty acid; LC, long chain; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptors

Key Words

Coenzyme A; organic acids; amino acid metabolism, inborn errors; fatty acid metabolism, inborn errors ; pathophysiology; expanded newborn screening.

Abstract

Coenzyme A (CoA) sequestration, toxicity or redistribution (CASTOR) is predicted to occur in many hereditary and acquired conditions in which the degradation of organic acyl esters of CoA is impaired. The resulting accumulation of CoA esters and reduction of acetyl-CoA and free CoA (CoASH) will then trigger a cascade of reactions leading to clinical disease. Most conditions detected by expanded neonatal screening are CASTOR diseases. We review acyl-CoA metabolism, including CoASH synthesis, transesterification of acyl-CoAs to glycine, glutamate or L-carnitine and hydrolysis of CoA esters. Because acyl-CoAs do not cross biological membranes, their main toxicity is intracellular, primarily within mitochondria. Treatment measures directed towards removal of circulating metabolites do not address this central problem of intracellular acyl-CoA accumulation. Treatments usually involve the restriction of dietary precursors and administration of agents like L-carnitine and glycine, which can accept the transfer of acyl groups from acyl-CoA, liberating CoASH. Many hereditary CASTOR patients are chronically ill, with persistent symptoms and continuously abnormal metabolites in blood and urine despite good compliance with treatment. Conversely, asymptomatic patients are also common in hereditary CASTOR conditions. Future challenges include the understanding of pathophysiologic mechanisms in CASTOR diseases, the discovery of reliable predictors of outcome in individual patients and the establishment of therapeutic trials with sufficient numbers of patients to permit solid therapeutic conclusions.

Mammalian life is fueled by the degradation of organic compounds. Organic acids are produced from fat, amino acids and carbohydrates by a series of oxidative reactions leading to the transfer of high-energy electrons to the respiratory chain. Organic acids can also be ingested as drugs or toxins. Many organic acids require activation to Coenzyme A (CoA) thioesters in order to participate in biochemical reactions.

Many inborn errors of metabolism result from the deficiency of one of the enzymes acting on acyl-CoAs. The study of inborn errors of metabolism has evolved with such conditions as a paradigm. Most of these disorders are elegantly characterized enzymatically, genetically and by their plasma and urine metabolite profiles. Their ranges of clinical signs are increasingly known. In contrast, major questions remain about their pathophysiology and treatment.

CoA sequestration, toxicity and redistribution, a phenomenon that we term “CASTOR”, is the pathological situation that occurs when one or more acyl-CoA species accumulates to high levels. It is likely that the symptoms of diseases of acyl-CoA-related pathways derive ultimately from the high concentration of the acyl-CoA substrate of the deficient enzyme and/or from the reciprocal decrease of acetyl- or CoASH. These primary events initiate a cascade that culminates in chronic illness and acute decompensations.

The CASTOR phenomenon has been comparatively little studied. This lack of attention stems both from lack of reliable noninvasive methods to

accurately study tissue CoA status in humans and from the dearth of pertinent, viable animal models of CASTOR diseases. With some notable exceptions, data are lacking on intracellular CoA pools and their changes under different conditions in CASTOR diseases. Even the basic notion is seldom stated explicitly. In this review we outline CoA and acyl-CoA synthesis and degradation and major acyl transfer reactions, since each provides potential therapeutic options in CASTOR diseases. Finally, we use this as a framework to consider clinical observations and therapeutic goals in CASTOR diseases.

CASTOR disorders are usually classified by the dietary origin of their precursor compounds, for instance branched chain amino acids (BCAA) or long chain (LC) fatty acids (FA), and are often discussed with non-CASTOR diseases treated with similar diets. Hence they are rarely considered together as a group. This approach has advantages for dietary management but can portray CASTOR disorders anecdotally rather than as an important category of inborn and acquired disorders that share many common features. Grouping the CASTOR diseases together provides an opportunity to emphasize their collective importance and common pathophysiological properties.

CASTOR Disorders

Hereditary CASTOR diseases are a major segment of biochemical genetics. Over half of the conditions recommended for newborn screening by the American College of Medical Genetics are CASTOR diseases (Table 1). Because most hereditary CASTOR diseases are chronic and many are associated with acute decompensations, they cause substantial morbidity and

anxiety in patients and their families and occupy a disproportionately large fraction of biochemical geneticists' time.

CASTOR phenomena are also important in pharmacology and toxicology. Many drugs are organic acids or are metabolized to organic acids. Examples include valproic, salicylic, pivalic, phenylbutyric and benzoic acids (1). Some toxins also are metabolized to CoA esters. Hypoglycin for example is a well-characterized mitochondrial poison found in unripe ackee nuts, ingestion of which causes Jamaican vomiting sickness (2;3). A fraction of people exposed to these xenobiotics develop "Reye syndrome-like" episodes with hypoglycemia, coma, hyperammonemia and fatty liver resembling the acute decompensations of hereditary CASTOR conditions.

CoA Metabolism

CoA Synthesis & Degradation. CoA synthesis is cytoplasmic (4;5). The dietary precursor of CoASH is pantothenic acid (Figure 1), a vitamin that is abundant in nearly all diets and is also synthesized by gut flora (4). Dietary pantothenate loading can increase hepatic CoA content (e.g. (6;7)). The first and rate-limiting enzyme of CoASH synthesis, pantothenate kinase (PANK), has four known isozymes in mammals, encoded by distinct genes, PANK1-4, with two isoforms in PANK1 arising from use of alternate first exons. PANK isoforms are inhibited by CoASH and to some extent by long chain (LC)- and other acyl-CoAs. Different PANK isoforms show specific patterns of inhibition, with potential for differential regulation of CoASH synthesis even within the same subcellular compartment (8) (see fig. 2).

The roles of each mammalian PANK isoform remain to be elucidated. One, PANK2, is mitochondrial and causes the only known inborn error of CoA synthesis (9). PANK2 mutations cause the hereditary neurodegeneration previously named Hallervorden-Spatz disease, characterized by progressive rigidity, frequent mental retardation and convulsions and characteristic iron deposits in the globus pallidus (10). PANK2 is enzymatically active in vitro (11) but is inhibited by acyl CoAs (8). This was a paradox until recently, because it predicted that the high acyl-CoA concentrations in mitochondria would inactivate PANK2. Two important points have helped to clarify this. First, it was shown that inhibition by acyl-CoAs can be overridden by a stimulatory effect of palmitoylcarnitine (8). Second, PANK2 has not been precisely localized but arguments favor a location in the intermembrane space rather than the mitochondrial matrix (8). This would situate the entire CoA synthetic pathway in the cytoplasm. PANK2 is clearly important for brain metabolism but the mechanism of PANK2-related neurodegeneration is unknown. Gene-targeted PANK2-deficient mice do not develop neurodegeneration and attempts to produce a neurological phenotype by dietary pantothenate restriction were unsuccessful because PANK2-deficient animals rapidly died; interestingly, pantothenate-deficient normal mice did develop neurological signs (12).

CoA degradation is not well characterized in mammals, but does not appear to have a major role in controlling CoA levels (4). Interestingly, some enzymes can degrade CoA esters as well as CoA (4); it will be of interest to

see whether they may have some role in removing accumulated acyl-CoAs in CASTOR diseases.

CoA Transport and Mitochondria CoA and acyl-CoAs do not freely cross biological membranes, but a voltage-dependent mitochondrial uptake system exists (13). An inner mitochondrial membrane transport protein of *S cerevisiae* has been shown to be essential for maintenance of intramitochondrial CoA concentrations; expression of its human homologue, Graves Disease Protein, can restore normal CoA levels (14).

In one report, intravenous injection of CoASH to rats resulted in a measurable increase of hepatic CoA level (15) although its intracellular location was not determined. This observation goes against dogma but is potentially important for the treatment of CASTOR diseases, and merits reassessment using subcellular fractionation and modern methods of measurement.

Acyl-CoA Metabolism. Chemically, CoA esterification enhances the chemical reactivity of organic acids ((16), p 163). This strategy is widely used in catabolic pathways. Charts of intermediary metabolism show CoASH and acetyl-CoA to be major hubs of intermediary metabolism, participating in a large number of chemical reactions. This high level of connectivity implies that changes of free and/or acetyl-CoA levels will disrupt multiple pathways of cell metabolism. The early history of acetyl-CoA research was recounted by Fritz

Lipmann in his acceptance speech for the Nobel Prize for Physiology or Medicine (17), which he shared in 1953 with Hans Krebs.

Synthesis. Specific ATP-dependent acyl-CoA synthetases can generate CoA esters from carboxylic acids, consuming ATP and producing AMP and pyrophosphate (18). Different acyl CoA synthetases exist for long, very long, medium and short-chain acyl CoAs (18). LC-CoAs are synthesized in the cytoplasm and either transported into the mitochondria for beta oxidation using the carnitine shuttle, or used in other compartments for various functions. The five known human LC-CoA synthetases are designated ACS1 and ACS3-6 (18). It has been suggested that different ACSs may synthesize LC-CoAs selectively for specific metabolic pathways (19). A protein family with acyl-CoA synthetase activity towards very long chain FAs is also known (20;21).

Mitochondrial CoAs can arise from L-carnitine-mediated import of LC-CoAs or from mitochondrial synthesis. Medium and short chain carboxylic acids can enter mitochondria directly and be esterified to CoA by mitochondrial acyl-CoA synthetases (22). Most of the activity is attributable to three paralogous genes (ACSM1-3) on human chromosome 16p. ACSM1 (MACS1) and ACSM2 have overlapping specificities but ACSM2 is relatively more active towards benzoate and phenylacetate and ACSM1, to octanoate (23-25); ACSM3 (SA Hypertension-Associated Protein) is reported to be most active with short chain organic acids like propionate and butyrate (25). Acyl-CoAs are also generated in mitochondria by the reactions of branched chain

ketoacid dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase.

Recently, Zhang *et al* (26) induced CoA deficiency in mice by administration of hopantenate, a methylated pantothenate analogue that these authors showed to inhibit all mammalian PANK isoforms tested. This interesting compound has been used in some countries as a neurological stimulant because it releases gamma aminobutyric acid on degradation (26), but multiple cases of Reye syndrome-like episodes have been reported in treated individuals (27-31). All mice to which hopantenate was administered died of hypoglycemia within 5-15 days, with fatty liver and mitochondrial dysmorphology. This article provides a fascinating glimpse of CoA dynamics, showing rapid turnover in liver and kidney compared to brain or heart. A transcriptional reprogramming occurs in hopantenate-treated liver which includes increased expression of thioesterases which cleave acyl-CoAs to CoASH, and of PDH kinase isoform 4, which inhibits flux by pyruvate dehydrogenase (PDH). Although some of these observations require independent confirmation with methods that are completely independent of drug distribution, these original data clearly show the importance of liver in CoA metabolism, the kinetics of liver CoA turnover, a first view of the cascade of compensatory changes generated by CoA deficiency and its correction by pantothenate supplementation.

Concentration CoA is unevenly distributed among several intracellular pools. Most recent work involves cytoplasmic LC-CoA. Although total cytoplasmic

LC-CoA concentrations vary from about 40 to 200 $\mu\text{mol/L}$, the actual free LC-CoA concentration appears to be 10^3 to 10^4 -fold lower (32;33) because of avid binding to 10 kDa cytoplasmic acyl-CoA binding proteins (ACBPs, K_d , ~ 1 -10 nmol/L) and to fatty acid binding proteins (FABPs, K_d for LC-CoA, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ (34)). In rat liver under basal nourished conditions, nearly all cellular long-chain CoA (40-60 nmol/g) is bound to ACBPs (40-50 nmol/g) (32). The notion of a low free cytoplasmic LC-CoA concentration is supported physiologically by observing that hepatic lipogenesis clearly occurs despite the strong inhibition by LC-CoA of the regulatory enzyme, acetyl CoA carboxylase (K_i , 6 nmol/L) (35;36). Even at the high physiological LC-CoA level of 150 $\mu\text{mol/L}$, a free cytoplasmic LC-CoA concentration of only 200 nmol/L is predicted (32;33).

It has been suggested that ACBP binding may enhance certain metabolic pathways of CoA utilization, if for some enzymes the affinity for the acyl CoA–ACBP complex exceeds that for free acyl-CoAs (33). ACBPs may also protect LC-CoAs from cytoplasmic thioesterases, which are thought to be a surveillance system that prevents LC-CoA concentrations from achieving toxic levels. A transgenic mouse expressing 33% higher liver ACBP levels than controls showed increased triglyceride levels and altered distribution of LC-CoA between cytosol and membrane fractions (37), consistent with a physiological importance for ACBPs.

In mitochondria, the site of most CASTOR diseases, free acyl-CoA concentrations markedly exceed those in cytoplasm. In the mitochondrial

matrix, total acyl-CoA concentrations are over 10-fold higher than in cytoplasm (5;32;38) and ACBPs and FABPs are absent (32). In rat heart, the mitochondrial matrix total CoA concentration is calculated to be 2.3 mmol/L (39). Over 95% of cardiomyocyte CoA is mitochondrial (39) and in rat liver, about 75% (40).

CoA ester pools in microsomes and in peroxisomes are also physiologically important, for instance for microsomal triglyceride synthesis and peroxisomal beta oxidation and bile acid synthesis. These distinct CoA pools permit several different metabolic environments to cohabit a single cell. Abnormalities of extramitochondrial CoA pools may contribute to some disease states, but consideration of this is beyond the scope of this review.

Physiological changes in cellular CoA concentrations.

Moderate changes occur in cellular CoA levels occur with physiological stresses. In rat liver, fasting causes a 2-3 fold increase in LC-CoAs (41;42) with relative preservation of CoASH and acetyl-CoA levels. Untreated diabetes is also associated with a similar increase in LC-CoAs (41). In working rat heart, 20 minutes of ischemic perfusion causes a 2-fold increase in mitochondrial matrix LC-CoA with a corresponding decrease in the acid-soluble CoA fraction (38). After exercise to exhaustion in human skeletal muscle, under both normal and hypoxic conditions, the concentration of acetyl-CoA doubles, with little change in other acyl-CoA, total, or free CoA pools (43). These studies demonstrate that CoA pools are preserved under physiological

conditions and even under moderate to severe ischemia. In CASTOR diseases, these physiological changes will be superposed upon the primary changes within the CoA pools.

Elegant classic studies in which isolated normal cells are incubated with nutrient compounds like FAs or BCAAs (e.g., (44;45)), demonstrate rapid changes in cellular CoA pools and provide much valuable data. An important consideration is that for normal cells, such compounds are alternate energy substrates while in CASTOR diseases, they are non-metabolizable toxins.

Properties of Acyl-CoAs Cytoplasmic long chain fatty acyl-CoAs (LC-CoAs) are under intense study for their possible role in diabetes. Examples include inhibition of the adenine nucleotide transporter (the main physiological determinant of mitochondrial oxidation), inhibition of acetyl CoA carboxylase (ACC, $K_i < 6$ nmol/L) and LC acyl CoA dehydrogenase ($K_i \sim 200$ nmol/L), activation of AMPK kinase (50-200 nmol/L) and many other activities at higher concentrations (reviewed in (32)). Because of the low free LC-CoA concentration in the cytoplasm, the physiological significance of actions with $K_i > 10$ nmol/L is uncertain. LC-CoAs can influence transcription (ex, FadR, the *E coli*, FA synthetase (33)) and in eukaryotes, have been demonstrated to bind to the transcription factor HNF-4 α (46;47). LC-CoAs can also exert physicochemical effects. For instance, their detergent properties can disrupt cell membranes (32), but the low concentration of free LC-CoA suggests that this is not a threat under most conditions.

In comparison to LC-CoAs, the study of potential mechanisms of toxicity in mitochondrial CASTOR states is less advanced. In many articles, there is incomplete documentation of the subcellular pools involved in these processes and of the identity of the acyl-CoA species that comprise the acid-soluble and acid insoluble fractions. This will be a key consideration in the future: specific biochemical effects are well-documented for individual acyl-CoAs like acetyl-CoA and malonyl-CoA (48;49) and it is likely that some of the acyl-CoAs that accumulate only in individual CASTOR diseases will have specific effects as well. Seminal biochemical papers familiar to most biochemical geneticists have studied the effects of various CoA species on key enzymes with CoA or acyl-CoA substrates (e.g. (50-56)) including 2-ketoglutarate dehydrogenase, citrate synthase; pyruvate dehydrogenase; pyruvate carboxylase (PC, stimulated by acetyl-CoA) and carbamylphosphate and N-acetylglutamate synthetases (CPS, NAG synthetase). It will be exciting to link these enzymological findings with direct documentation of intracellular acyl-CoAs in appropriate models of CASTOR diseases.

Acyl Group Transfer Reactions. There are two main receptor molecules for acyl group transfer from CoA esters: L-carnitine and amino acids. Both reactions release CoASH from acyl-CoAs and form diffusible molecules that can be excreted.

Glucuronidation is a major fate of many non-degradable carboxylic acids, but this occurs in smooth endoplasmic reticulum (1) and is not available to the CoA esters that accumulate in mitochondrial CASTOR states.

L-Carnitine L-carnitine and carnitine esters readily cross mitochondrial and cell membranes by a well-described system of transporters (57). Carnitine transferases mediate acyl group exchanges between the esterified and free forms of L-carnitine and of CoA. L-carnitine thus offers a route for removal of accumulated acyl groups from mitochondria (e.g. (58)).

L-carnitine is primarily intracellular. In healthy adults (59) total plasma carnitine ranges from 23 to 60 $\mu\text{mol/L}$, and esterified carnitine, from 0 to 14 $\mu\text{mol/L}$. In contrast, total carnitine levels are estimated at 1 mmol/kg wet weight in liver, 1.3 in heart and 4.2 in skeletal muscle (60). 97% of body carnitine stores are in skeletal muscle (60).

Carnitine is mainly cytoplasmic; in heart for instance, >95% of total carnitine is cytoplasmic (39). The cytoplasmic total L-carnitine concentration, about 2 mmol/L, exceeds cytoplasmic CoA levels more than 10-fold (39).

The two known mitochondrial matrix carnitine acyltransferases are carnitine palmitoyltransferase II and carnitine acetyltransferase. Another carnitine acyltransferase with activity against medium chain substrates (carnitine octanoyltransferase), is peroxisomal. Presumably one or both of the known mitochondrial carnitine transferases transfer other acyl groups to L-carnitine under CASTOR conditions. Avian carnitine acetyltransferase has substantial activities against C4 and C6 substrates (61), suggesting that this enzyme is a prime candidate for this task in CASTOR states. The substrate specificity of the mitochondrial matrix carnitine acyltransferase reactions is a

critical point for CASTOR diseases, but to our knowledge, their spectra of activity have not been determined towards the acyl-CoAs that accumulate in mitochondrial CASTOR conditions.

In some (62) but not all (63) CASTOR disease patients, pharmacological doses of L-carnitine can be therapeutically effective. At least two factors potentially limit the efficiency of carnitine therapy of CASTOR conditions, substrate specificity of the carnitine acyl transferases and access of L-carnitine to the mitochondrial matrix. Isovaleryl- and propionyl-CoA are good substrates (62;64). Conversely, several other CoA esters of BCAA degradation are predicted to be poor substrates, because of the low levels of the corresponding branched chain acylcarnitines in patients with hereditary CASTOR diseases of BCAA degradation, and also based upon direct measurements of the effect of L-carnitine in cultured cells loaded with BCAA (65). In rats, intravenous administration of L-carnitine produced changes in plasma acyl-CoAs within one minute, showing rapid exchange with the mitochondrial matrix (42). However, the capacity of L-carnitine transport is less than that of the pathways of fat and amino acid degradation that generate intramitochondrial acyl-CoAs (42) suggesting that carnitine conjugation, although important, may be overwhelmed during active catabolism of precursor compounds, permitting the establishment of an acute CASTOR state.

Amino acids. Conjugation to amino acids produces compounds that are readily excreted, liberating CoASH. Aromatic CoA esters of benzoic and

phenylacetic acids are well conjugated, as is isovaleryl-CoA (1). Glycine is the preferred amino acid substrate for most conjugation reactions in human mitochondria except for phenylacetate, for which glutamine is the main substrate.

The 34 kDa mitochondrial matrix monomer, glycine N-acyltransferase (GLYAT) (66-68), is particularly enriched in liver and kidney. Human GLYAT requires several months after birth to attain its maximum capacity in human liver (69). There are important interspecies differences. For instance, bovine mitochondria are reported to have two transferase enzymes, with activities towards aromatic and aryl-CoAs, respectively, and conjugate phenylacetate preferentially to glycine rather than glutamine. Several GLYAT paralogues exist in the human genome that have not been characterized in detail.

Human GLYAT has substantial capacity towards its preferred substrates, with indisputable therapeutic impact. The conjugation rate of benzoate and phenylacetate can rival the rate of ureagenesis (70-72), and their administration is a mainstay of the treatment of hereditary hyperammonemias. Also, most isovaleric acidemia patients respond well to glycine supplementation (62).

The therapeutic utility of glycine supplementation is limited in CASTOR diseases by the restricted spectrum of GLYAT towards acyl-CoAs. Many acyl-CoAs important in CASTOR diseases do not react efficiently with GLYAT. Furthermore, the concentration of GLYAT activity in liver and kidney suggests

that glycine conjugation may have little protective effect on CASTOR conditions in other organs. This is corroborated by the study of metabolites following hepatic transplantation (73).

Clinical experience shows that even massive doses of L-carnitine and of glycine do not normalize most CASTOR type inborn errors. Although both types of treatment should be considered in CASTOR patients, CASTOR patients can experience decompensations and develop complications, despite carnitine and amino acid supplementation.

Hydrolysis of Acyl-CoAs

Acyl-CoA Thioesterases can hydrolyze acyl-CoAs, freeing both the organic acid and CoA moieties. They are encoded by a family of genes designated ACOT 1-10 (74). Each has a characteristic cellular distribution and acyl group specificity. In practice, the precise physiological impact of each is poorly known but these proteins clearly occupy a strategic place in metabolism (75).

The action of thioesterases in mitochondria is energetically wasteful, since it dissipates the energy of the thioester bond. Although disadvantageous in most situations, under CASTOR conditions, when mitochondrial well-being is presumably jeopardized by high acyl-CoA and low CoASH levels, thioesterase action may be protective.

ACOT2 is the main mitochondrial ACOT. It is active primarily against LC-CoAs, with little activity towards acyl-CoAs with chains shorter than 10 carbon atoms (76). Accumulated CoA esters are shorter than this in most

CASTOR diseases, with the exception of inborn errors of LC-CoA metabolism. Of note, short chain thiolase activity is detectable in mitochondrial isolates (77;78). A portion of the mitochondrial acetyl-CoA thioesterase activity is attributable to a side reaction of 3-ketoacyl-CoA thiolase (79).

The peroxisomal enzyme ACOT8 has a broad range of activity towards medium chain acyl CoAs. However, it presumably does not interact directly with the CoA pools that accumulate in CASTOR diseases. An interorganellar carnitine-mediated shuttle of acyl moieties, such as proposed for acetyl groups (80) could indirectly bring some of the accumulated acyl groups into contact with this enzyme. However, this is speculative.

The urine of most patients with CASTOR diseases contains elevated levels of organic acid(s) characteristic of that condition. This suggests that a substantial fraction of the accumulated thioesters may be hydrolyzed directly. In some conditions like the methylmalonic acidemias, this may be an important mode of detoxification (81).

One inborn error of thioesterase function has been described, deficiency of 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, in the valine catabolic pathway. Of the two known patients, the first had multiple malformations (82) and the second, repeated ketoacidotic episodes and basal ganglion changes suggestive of Leigh disease (83). On neonatal screening, the second patient was identified by an elevation of hydroxy-C₄-carnitine. In the rat, 3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase is highly expressed in all tissues

tested (84). It is hypothesized that its high specific activity with respect to other enzymes of valine degradation is an adaptation to reduce the level of methacrylyl-CoA, which is felt to be toxic and is in equilibrium with 3-hydroxyisobutyryl-CoA (82;84)

A methylmalonyl-CoA-specific thioesterase was described in 1983 (85) but to our knowledge this observation has not been followed by molecular or further biochemical studies

Exogenous organic acids

There are metabolic and clinical similarities between the CASTOR phenomena in hereditary metabolic diseases and those related to carboxylic acid toxins and drugs. For cytoplasmic acyl-CoAs, microsomal hydroxylation by cytochrome P450s and peroxisomal omega oxidation occur. In mitochondria, conjugation to glycine or glutamine can occur both with endogenous CoAs and some xenobiotic carboxylic acids. Rare acute Reye syndrome-like episodes have been described during chronic treatment with many carboxylic acid drugs and xenobiotics. This is reminiscent of the episodic nature of most CASTOR conditions, with asymptomatic periods punctuated by severe crises.

Pathophysiology of CASTOR diseases

Major gaps exist in our understanding of CASTOR diseases, particularly knowledge of the underlying biochemical mechanisms. There are few direct measurements of the concentrations and fluxes of different CoA derivatives in

animal models or in relevant human tissues. However, several predictions based on general biochemical principals are consistent with clinical observations in CASTOR diseases. The following paragraphs explore this and offer some testable hypotheses.

Each CASTOR disease is predicted to produce a distinct CoA profile, since its diagnostic patterns of urine organic acids and plasma acylcarnitines presumably reflect elevated intracellular concentrations of the corresponding CoA esters. Presumably this unique pattern, the intensity of which will be determined by the local flux of precursor degradation, gives rise to the clinical differences among different CASTOR conditions. Conversely, elements common to many CASTOR diseases disease probably include reduction of the availability of CoASH and/or of acetyl CoA and the prominence of the liver in CoA-mediated metabolism. The toxicity of accumulated acyl-CoAs or the reduced amounts of free or acetyl CoA may influence metabolism directly, as lack of substrates for essential reactions or as inhibitors to reactions requiring CoA. Secondary effects presumably radiate from these primary events, including inhibition of major metabolic pathways like the Krebs cycle, ureagenesis and of mitochondrial redox state, activation of non-physiological detoxification pathways or deficiency of the downstream products of the metabolic pathway. It is also plausible that CoA and acyl-CoAs, which are profoundly embedded in energy and intermediary metabolism, may serve as metabolite signals and influence cell physiology in other fashions than via their traditional metabolic roles.

Levels of clinical severity Two clinical states, acute and chronic, are easily distinguished in patients with classical hereditary CASTOR diseases. By “acute” we refer to the classic presentations of untreated patients, usually as neonates or infants (86). The child is extremely ill, often comatose, acidotic, hypoglycemic and hyperammonemic, possibly with liver, heart or multiple organ dysfunction. We view the acute CASTOR state as an unsustainable situation in which basic cell processes are compromised because beyond a critical threshold of acyl-CoA accumulation, or perhaps of CoASH or acetyl-CoA depletion, inhibition of major pathways like gluconeogenesis, oxidative phosphorylation and ureagenesis occurs. These effects will become evident rapidly, because of the high flux of these pathways, and will persist for hours or days because of the impaired clearance of the accumulated acyl-CoAs.

Today, most CASTOR patients survive their initial presentations but few enjoy normal health. Patients in the chronic CASTOR state may fail to thrive, have chronic symptoms and continuous elevations of metabolites in blood and urine. This can occur despite optimal compliance with therapeutic recommendations. These chronically-ill CASTOR disease patients exist in a precarious, abnormal metabolic state, compatible with prolonged survival at the expense of continual intracellular stresses of as-yet unknown nature that render the patient chronically ill despite the lack of overt abnormalities of energy or nitrogen metabolism. CASTOR conditions may displace the patient’s “set point” towards the acute CASTOR threshold so that minor physiological fluctuations of CoA levels might precipitate an acute crisis. If this

concept is correct, description of the changes of chronic CASTOR states will be of major importance in the future.

Importantly, in some hereditary CASTOR conditions, most affected individuals are asymptomatic, despite having markedly abnormal metabolite profiles and despite the fact that other patients with the same disease may be highly symptomatic. For example, asymptomatic patients are well known in methylmalonic acidemia (87), short chain acyl CoA dehydrogenase deficiency (88) and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency (89). Such individuals are being increasingly detected by expanded newborn screening. There are two interpretations of this within the CASTOR framework. An optimistic interpretation of this is that complete correction of cellular CoA level and pattern may not be necessary for normal health: partial correction of the CoA profile may suffice, and some genetic, environmental or pharmacological variables may be strongly protective. Conversely, some CASTOR patients with prolonged initial asymptomatic periods can experience catastrophic decompensations. This is well-documented in many clinically-normal presymptomatic patients with MCAD deficiency and glutaric acidemia type I (90). It will be important to develop prognostic indicators for counseling families with affected asymptomatic children.

Cell autonomy. Sequestration of CoA esters is normally advantageous, allowing different CoA pools to mediate distinct metabolic processes in each subcellular compartment (80). Under CASTOR conditions, *intracellular* accumulation of metabolites is the central pathogenic mechanism. Reduction

of circulating metabolite levels is the gold standard for treatment of non-CASTOR inborn errors of metabolism like phenylketonuria. Complete correction of metabolite levels is rare in CASTOR diseases, and furthermore is predicted to be insufficient because abnormal intracellular conditions may not necessarily be reflected in the levels of circulating or urinary metabolites.

CASTOR phenomena therefore are part of the expanding group of metabolic conditions in which individual cell metabolism or regional transport play a central role. Other examples include hepatorenal tyrosinemia (91), respiratory chain and lysosomal diseases (92) and possibly conditions with cerebral accumulation of dicarboxylic acids, which apparently traverse the blood brain barrier poorly (93).

Some organic acids that form CoA esters may also be toxic in their diffusible free form. This mechanism of toxicity, complementary to CASTOR phenomena, is beyond the scope of this review and does not reduce the argument that CASTOR effects are likely central and primary. The prediction that CASTOR effects are cell-autonomous is consistent with certain important clinical observations.

Tissue specificity in CASTOR diseases: the liver and beyond The liver was the initial focus in CASTOR diseases because of its central importance in energy homeostasis and ureagenesis. Also, Reye-syndrome like symptoms that suggest liver dysfunction are prominent in many CASTOR diseases, including hypoglycemia, lactic acidosis, hyperammonemia and fatty liver.

The advantages and weaknesses of the hepatocentric view of CASTOR phenomena are both illustrated by the inborn errors of BCAA metabolism. Physiologically, most BCAA are transaminated in extrahepatic tissues, circulate as branched chain ketoacids, then are degraded in liver mitochondria. The branched chain ketoacid dehydrogenase complex is concentrated in liver and generates CoA esters, confining most subsequent metabolic steps to hepatocyte mitochondria. However, low but measurable levels of branched chain ketoacid dehydrogenase complex exist in most tissues (94).

In some patients with CASTOR diseases of BCAA metabolism, liver-related symptoms can be incapacitating. Liver transplantation can greatly improve general well being of such patients. It provides a decisive test for the hepatocentric model of CASTOR diseases. In these patients, acylglycines, which are produced by liver conjugation, normalize almost immediately after transplantation but other metabolites (acylcarnitines, 3-hydroxypropionate, propionylcarnitine, methylcitrate) remain abnormal (73). Clinically, transplanted patients with normal liver function can develop extrahepatic events like acute “metabolic strokes” (95-97). The persistence of clinical and biochemical abnormalities after liver transplantation, strongly suggests that major CASTOR phenomena exist in extrahepatic tissues.

Extrahepatic manifestations of CASTOR diseases tend to be disease-specific. In different CASTOR diseases, hypertrophic cardiomyopathy, pancreatitis, hematopoietic abnormalities, skeletal myopathy and other

complications can occur (98). For instance, neurological manifestations of CASTOR diseases include the metabolic strokes mentioned above in methylmalonic acidemia, diffuse white matter abnormalities with periventricular foci in 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase deficiency (99), the peripheral white matter lesions and spongiosis, cerebellar atrophy and increased signal intensity of dentate nuclei, globi pallidi and decreased signal intensity of the thalamus, characteristic of 2-hydroxyglutaric acidemia (100;101) and the characteristic basal ganglia and white matter abnormalities of patients with the infantile- and late-onset forms of glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency, respectively (102). Also, many CASTOR disease patients have global developmental delay, presumably in part due to brain-specific CASTOR phenomena. We suggest that the broad extrahepatic spectrum of CASTOR diseases reflects both the toxicities of the CoA profile of the individual diseases and the tissue distribution of the metabolic pathways that produce them.

Many questions remain. In particular, why do some patients develop complications while others escape unscathed?

Treatment considerations

Discussion of the management of individual CASTOR diseases, presented in standard works (92) is beyond the scope of this review, but some principals of treatment recur in many different CASTOR diseases. During acute decompensations, general supportive measures can be life-saving, and

include meticulous adjustment of fluid and electrolyte balance and glycemia, cardiorespiratory support as necessary and early detection and treatment of infections.

Specific therapeutic goals should aim to increase CoASH levels and decrease acyl-CoA levels. Promotion of an anabolic state is a mainstay of treatment. Avoidance of excess precursor intake is a major part of the clinical management of inborn metabolic diseases and must be adjusted according to each patient's clinical tolerance. In propionic and methylmalonic acidemias, suppression of the gut flora that synthesize propionate can be helpful (103). L-carnitine and glycine supplementation should be considered according to the patient's diagnosis and optimized individually. Exogenous organic acid drugs should be avoided or administered to CASTOR disease patients only with great caution and if necessary, as they may form CoA esters, further reducing the CoASH pool.

There is little reported experience with pantothenate administration to increase tissue CoA content or with agents to increase mitochondrial mass, both of which have theoretical appeal. There is potential risk in increasing CoA content: not only would the concentrations of free and acetyl-CoA increase but presumably also those of the abnormal acyl-CoAs. Since it is currently unknown how much of the damage of CASTOR diseases is due to toxicity and how much to deficiency of free and acetyl-CoAs, it is difficult to predict the effects of a general increase in the CoA pool.

Organ transplantation and by extension gene therapy can be powerful treatments for specific organs severely affected by CASTOR diseases (98). However, CASTOR phenomena may persist in untreated cells and organs.

Several methodological challenges confront future research into CASTOR diseases: precise, routine ways of profiling tissue CoA esters from small biopsies, development of noninvasive methods that precisely reflect the intracellular CoA profile, development of animal models that closely resemble human CASTOR diseases, for better understanding of disease mechanisms and for preclinical testing of potential treatments, and the development of multicentric studies with sufficient numbers of patients with individual CASTOR diseases to enable meaningful therapeutic trials and to uncover the genetic, pharmacological, dietary and other factors that underlie the extensive interpatient variability in these conditions.

Conclusion

CASTOR diseases are a major challenge for clinical metabolic genetics. Over half of births in many countries are now screened for several of these conditions, but available therapies are not optimal and prognosis is unpredictable at the time of diagnosis. The length of this review does not permit an exhaustive listing of many important works about CASTOR conditions. It is hoped however, that this discussion of some general considerations relevant to the many CASTOR diseases will encourage

concerted interdisciplinary efforts to understand common underlying mechanisms, to discover clinically relevant prognostic indicators and to develop and test new treatments.

Acknowledgements

We thank Ronald Wanders and Stefan Alexson for interesting discussions.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Structure of Coenzyme A. The components from which CoASH is synthesized are easily identifiable: pantothenic acid, cysteine and adenine (4). CoASH degradation is one source of beta alanine (26).

Figure 2. Mitochondrial energy metabolism from the perspective of CoA. Schematically, three sectors of intermediary metabolism can be distinguished: (1) “pre-CoA” conditions, largely diseases in which the toxic metabolite is freely diffusible (indicated by the irregular polyhedron, lower left), (2) CASTOR conditions and (3) inborn errors of terminal energy metabolism (“post-CoA” respiratory chain diseases, rectangle on the right). The normal metabolism of acyl-CoAs, shown schematically, involves many different enzymes, accounting for the large number of CASTOR diseases, and typically ends with production of acetyl- or propionyl-CoA. FAs and BCAAs are metabolized as CoA esters through much of their catabolic pathways. Glucose undergoes substantial metabolism in an unesterified form, generating small amounts of NADH by aerobic glycolysis (not shown), then traversing two CoA-dependent steps before and during the Krebs cycle (acetyl-CoA and succinyl-CoA), before donating reducing equivalents to the respiratory chain. Hepatic ketogenesis (upper right) can be viewed as a strategy for liberating CoASH. The numerous extramitochondrial synthetic functions of CoA are not shown. CoA and acyl-CoA metabolism could potentially be manipulated by modifying (1) CoA synthesis, (2) CoA degradation, (3) transfer of the acyl group from acyl-CoA to receptor molecules or (4) by stimulating acyl-CoA thioester cleavage. T2,

acetoacetyl-CoA:CoA acetyl transferase; mHS, mitochondrial HMG-CoA synthase; HL, HMG-CoA lyase.

Table I. CASTOR Diseases and Neonatal Screening.

| Condition | Primary Target ? | CASTOR Disease? | SCORE | Rank (%ile) |
|--|------------------|-----------------|-------|-------------|
| Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Yes | + | 1799 | 1.00 |
| Congenital hypothyroidism | Yes | | 1718 | 0.99 |
| Phenylketonuria | Yes | | 1663 | 0.98 |
| Neonatal hyperbilirubinemia (Kernicterus) | Yes | | 1584 | 0.96 |
| Biotinidase deficiency | Yes | + | 1566 | 0.95 |
| Sickle cell anemia (Hb SS disease) Hb | Yes | | 1542 | 0.94 |
| Congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) | Yes | | 1533 | 0.93 |
| Isovaleric acidemia | Yes | + | 1493 | 0.89 |
| Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Yes | + | 1493 | 0.89 |
| Maple syrup disease | Yes | | 1493 | 0.89 |
| Classical galactosemia | Yes | | 1473 | 0.88 |
| Hb S/ β -thalassemia | Yes | | 1455 | 0.87 |
| Hb S/C disease | Yes | | 1453 | 0.86 |
| Long-chain L-3-OH acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Yes | + | 1445 | 0.84 |
| Glutaric acidemia type I | Yes | + | 1435 | 0.83 |
| 3-Hydroxy-3-methylglutaric Acidemia | Yes | + | 1420 | 0.82 |
| Trifunctional protein deficiency | Yes | + | 1418 | 0.81 |
| Multiple carboxylase deficiency | Yes | + | 1386 | 0.80 |
| Benign hyperphenylalaninemia | Yes | | 1365 | 0.78 |
| Methylmalonic acidemia (mutase deficiency) | Yes | + | 1358 | 0.77 |
| Homocystinuria (due to CBS deficiency) | Yes | | 1357 | 0.76 |
| 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency | Yes | + | 1355 | 0.75 |
| Hearing loss | Yes | | 1354 | 0.73 |
| Methylmalonic acidemia (Cbl A,B) | Yes | + | 1343 | 0.72 |
| Propionic acidemia | Yes | + | 1333 | 0.71 |

| | | | | |
|---|-----|---|------|------|
| Carnitine uptake defect | Yes | + | 1309 | 0.69 |
| Galactokinase deficiency | Yes | | 1286 | 0.69 |
| Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency | Yes | | 1286 | 0.67 |
| β -Ketothiolase deficiency | Yes | + | 1282 | 0.66 |
| Citrullinemia | Yes | | 1266 | 0.65 |
| Argininosuccinic acidemia | Yes | | 1263 | 0.64 |
| Tyrosinemia type I | Yes | | 1257 | 0.63 |
| Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Yes | + | 1252 | 0.61 |
| Tyrosinemia type II | Yes | | 1249 | 0.60 |
| Glutaric acidemia type II | Yes | + | 1224 | 0.59 |
| Medium/short-chain L-3-OH acyl-CoA dehydrogenase deficiency | Yes | + | 1223 | 0.58 |
| Cystic fibrosis | Yes | | 1200 | 0.57 |
| Variant Hemoglobinopathies (including HB E) | No | | 1199 | 0.55 |
| Human HIV infection | No | | 1193 | 0.54 |
| Defects of bipterin cofactor biosynthesis | No | | 1174 | 0.53 |
| Medium-chain ketoacyl-CoA thiolase deficiency | No | + | 1170 | 0.52 |
| Carnitine palmitoyltransferase II deficiency | No | + | 1169 | 0.51 |
| Methylmalonic acidemia (Cbl C,D) | No | + | 1166 | 0.49 |
| Argininemia | No | | 1151 | 0.48 |
| Tyrosinemia type III | No | | 1149 | 0.47 |
| Defects of bipterin cofactor regeneration | No | | 1146 | 0.46 |
| Malonic acidemia | No | + | 1143 | 0.45 |
| Carnitine: acylcarnitine translocase deficiency | No | + | 1141 | 0.43 |
| Isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency | No | + | 1134 | 0.42 |
| 2-Methyl 3-hydroxybutyric aciduria | No | + | 1132 | 0.41 |
| Carnitine palmitoyltransferase I deficiency (liver) | No | | 1131 | 0.40 |
| 2-Methylbutyryl-CoA dehydrogenase deficiency | No | + | 1124 | 0.39 |
| Hypermethioninemia | No | | 1121 | 0.37 |
| Dienoyl-CoA reductase deficiency | No | + | 1119 | 0.36 |
| Galactose epimerase deficiency | No | | 1066 | 0.35 |

| | | | | |
|--|----|---|------|------|
| 3-Methylglutaconic aciduria | No | + | 1057 | 0.34 |
| Severe combined immunodeficiency | No | | 1047 | 0.33 |
| Congenital toxoplasmosis | No | | 1041 | 0.31 |
| Familial hypercholesterolemia (heterozygote) | No | | 1038 | 0.30 |
| Carnitine palmitoyltransferase I deficiency (muscle) | No | | 1009 | 0.29 |

Adapted from Table I of The American College of Medical Genetics report for the US Department of Health and Human Services, *Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System* (104). The scoring system for advisability of screening is based on expert opinion and reflects the strength of scientific evidence about the following criteria: availability of a screening test, treatment efficiency, understanding of natural history and clinical significance of the condition. The highest scores indicates favorable characteristics for screening. Diseases scoring 1200 or more are considered to be good candidates for neonatal screening. Of 29 such diseases, 18 are CASTOR conditions. Conditions scoring 1000 or more are shown.

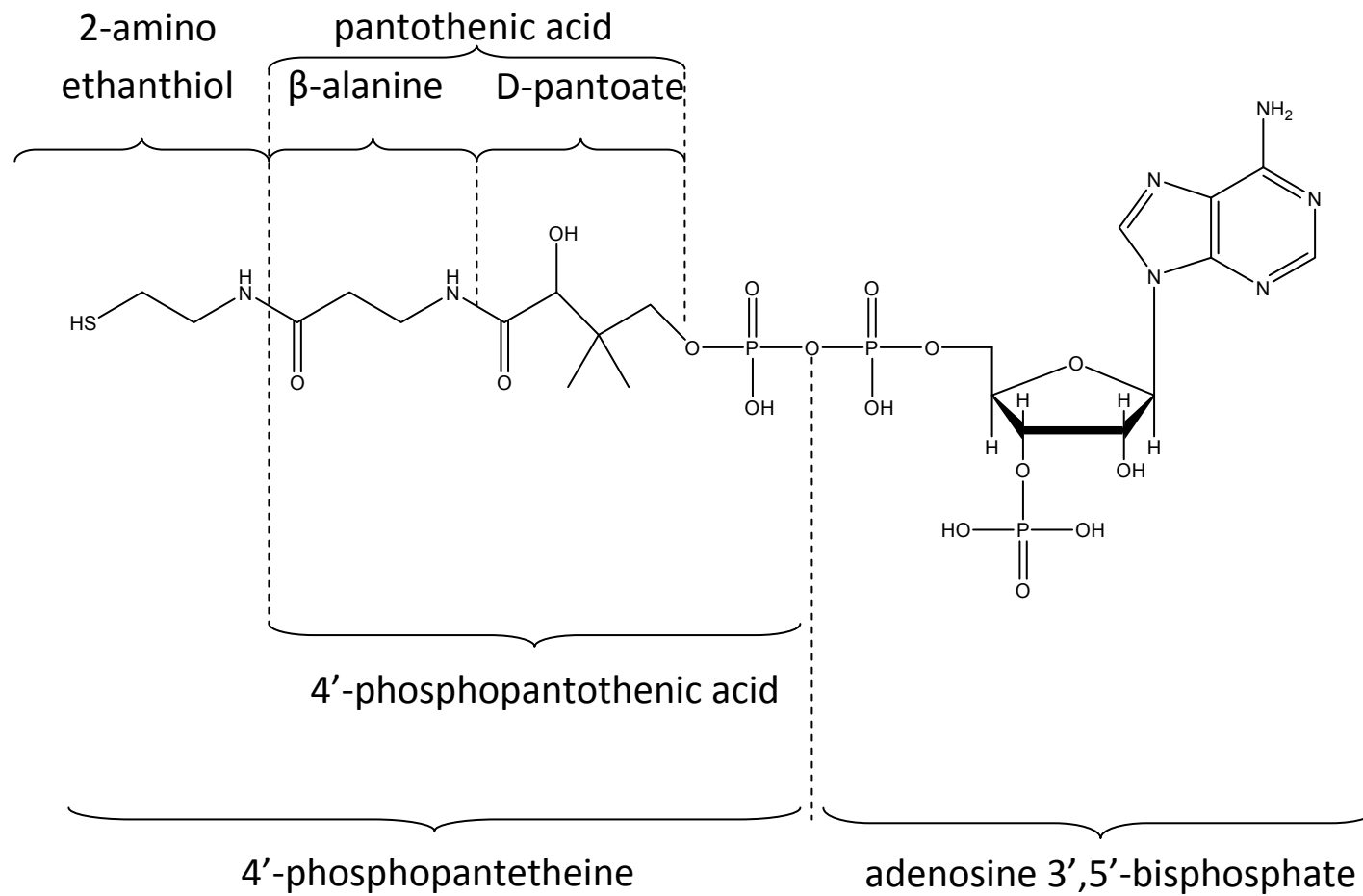


Figure 1

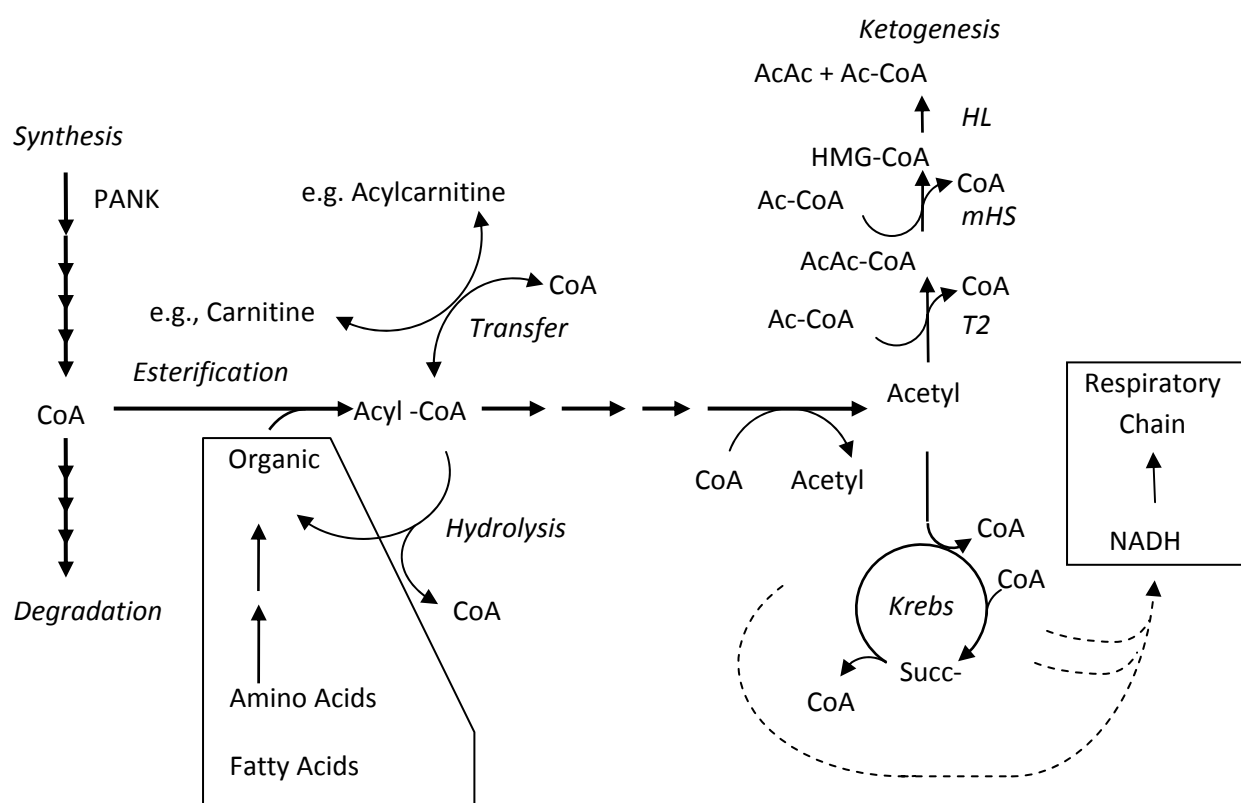


Figure 2

Reference List

- (1) Knights KM. Role of hepatic fatty acid:coenzyme A ligases in the metabolism of xenobiotic carboxylic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25(10):776-782.
- (2) Tanaka K, Kean EA, Johnson B. Jamaican vomiting sickness. Biochemical investigation of two cases. *N Engl J Med* 1976; 295(9):461-467.
- (3) Melde K, Jackson S, Bartlett K, Sherratt H, Shisla S. Metabolic consequence of methylenecyclopropylglycine poisoning in rats. *Biochem J* 1991; 274:395-400.
- (4) Leonardi R, Zhang YM, Rock CO, Jackowski S. Coenzyme A: back in action. *Prog Lipid Res* 2005; 44(2-3):125-153.
- (5) Tahiliani AG, Beinlich CJ. Pantothenic acid in health and disease. *Vitam Horm* 1991; 46:165-228.
- (6) Thurston JH, Hauhart RE. Amelioration of Adverse Effects of Valproic Acid on Ketogenesis and Liver Coenzyme A Metabolism by Cotreatment with Pantothenate and Carnitine in Developing Mice: Possible Clinical Significance. *Pediatr Res* 1992; 31:419-423.
- (7) Palekar A. Effect of pantothenic acid on hippurate formation in sodium benzoate-treated HepG2 cells. *Pediatr Res* 2000; 48(3):357-359.
- (8) Zhang YM, Rock CO, Jackowski S. Feedback regulation of murine pantothenate kinase 3 by coenzyme A and coenzyme A thioesters. *J Biol Chem* 2005; 280(38):32594-32601.
- (9) Johnson MA, Kuo YM, Westaway SK et al. Mitochondrial localization of human PANK2 and hypotheses of secondary iron accumulation in pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1012:282-298.
- (10) Hayflick SJ, Westaway SK, Levinson B et al. Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348(1):33-40.
- (11) Kotzbauer PT, Truax AC, Trojanowski JQ, Lee VM. Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability, and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2. *J Neurosci* 2005; 25(3):689-698.

- (12) Kuo YM, Hayflick SJ, Gitschier J. Deprivation of pantothenic acid elicits a movement disorder and azoospermia in a mouse model of pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30(3):310-317.
- (13) Tahiliani AG. Dependence of mitochondrial coenzyme A uptake on the membrane electrical gradient. *J Biol Chem* 1989; 264(31):18426-18432.
- (14) Prohl C, Pelzer W, Diekert K et al. The yeast mitochondrial carrier Leu5p and its human homologue Graves' disease protein are required for accumulation of coenzyme A in the matrix. *Mol Cell Biol* 2001; 21(4):1089-1097.
- (15) Tholen H, Mordhorst R. Hepatic and cerebral coenzyme A contents after intravenous injection of coenzyme A in rats. *Experientia* 1976; 32(7):830-832.
- (16) Newsholme EA, Leech AR. *Biochemistry for the Medical Sciences*. New York, NY: John Wiley & Sons, 1983.
- (17) http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1953/lipmann-lecture.pdf
- (18) Mashek DG, Bornfeldt KE, Coleman RA et al. Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J Lipid Res* 2004; 45(10):1958-1961.
- (19) Li LO, Mashek DG, An J, Doughman SD, Newgard CB, Coleman RA. Overexpression of rat long chain acyl-coa synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem* 2006; 281(48):37246-37255.
- (20) Steinberg SJ, Morgenthaler J, Heinzer AK, Smith KD, Watkins PA. Very long-chain acyl-CoA synthetases. Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 2000; 275(45):35162-35169.
- (21) Pei Z, Fraisl P, Berger J, Jia Z, Forss-Petter S, Watkins PA. Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. *J Biol Chem* 2004; 279(52):54454-54462.
- (22) Vessey DA, Kelley M. Purification and partial sequencing of the XL-I form of xenobiotic-metabolizing medium chain fatty acid:CoA ligase from bovine liver mitochondria, and its homology with the essential hypertension protein. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1346(3):231-236.
- (23) Vessey DA, Kelley M, Warren RS. Characterization of the CoA ligases of human liver mitochondria catalyzing the activation of short- and medium-chain fatty acids and xenobiotic carboxylic acids. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1428(2-3):455-462.

- (24) Vessey DA, Lau E, Kelley M, Warren RS. Isolation, sequencing, and expression of a cDNA for the HXM-A form of xenobiotic/medium-chain fatty acid:CoA ligase from human liver mitochondria. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17(1):1-6.
- (25) Fujino T, Takei YA, Sone H et al. Molecular identification and characterization of two medium-chain acyl-CoA synthetases, MACS1 and the Sa gene product. *J Biol Chem* 2001; 276(38):35961-35966.
- (26) Zhang YM, Chohnan S, Virga KG et al. Chemical knockout of pantothenate kinase reveals the metabolic and genetic program responsible for hepatic coenzyme A homeostasis. *Chem Biol* 2007; 14(3):291-302.
- (27) Sasaki T, Minagawa M, Yamamoto T, Ichihashi H. A case of the Rett syndrome with acute encephalopathy induced during calcium hopantenate treatment. *Brain Dev* 1991; 13(1):52-55.
- (28) Nakanishi T, Funahashi S, Shimizu A, Hayashi A. Urinary organic acids in elderly Japanese patients with ketosis and encephalopathy who have taken panto-yl-gamma-aminobutyrate, calcium salt (calcium hopantenate, HOPA). *Clin Chim Acta* 1990; 188(1):85-90.
- (29) Kimura A, Yoshida I, Ono E et al. Acute encephalopathy with hyperammonemia and dicarboxylic aciduria during calcium hopantenate therapy: a patient report. *Brain Dev* 1986; 8(6):601-605.
- (30) Matsumoto M, Kuhara T, Inoue Y, Shinka T, Matsumoto I. Abnormal fatty acid metabolism in patients in hopantenate therapy during clinical episodes. *J Chromatogr* 1991; 562(1-2):139-145.
- (31) Noda S, Umezaki H, Yamamoto K, Araki T, Murakami T, Ishii N. Reye-like syndrome following treatment with the pantothenic acid antagonist, calcium hopantenate. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51(4):582-585.
- (32) Faergeman NJ, Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 1997; 323 (Pt 1):1-12.
- (33) Knudsen J, Neergaard TB, Gaigg B, Jensen MV, Hansen JK. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr* 2000; 130(2S Suppl):294S-298S.
- (34) Rolf B, Oudenampsen-Kruger E, Borchers T et al. Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver-type fatty acid binding protein. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259(3):245-253.

- (35) Ogiwara H, Tanabe T, Nikawa J, Numa S. Inhibition of rat-liver acetyl-coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A. Formation of equimolar enzyme-inhibitor complex. *Eur J Biochem* 1978; 89(1):33-41.
- (36) Nikawa J, Tanabe T, Ogiwara H, Shiba T, Numa S. Inhibitory effects of long-chain acyl coenzyme A analogues on rat liver acetyl coenzyme A carboxylase. *FEBS Lett* 1979; 102(2):223-226.
- (37) Huang H, Atshaves BP, Frolov A, Kier AB, Schroeder F. Acyl-coenzyme A binding protein expression alters liver fatty acyl-coenzyme A metabolism. *Biochemistry* 2005; 44(30):10282-10297.
- (38) Idell-Wenger JA, Grottyhann LW, Neely JR. An improved method for isolation of mitochondria in high yields from normal, ischemic, and autolyzed rat hearts. *Anal Biochem* 1982; 125(2):269-276.
- (39) Idell-Wenger JA, Grottyhann LW, Neely JR. Coenzyme A and carnitine distribution in normal and ischemic hearts. *J Biol Chem* 1978; 253(12):4310-4318.
- (40) Brass EP, Ruff LJ. Rat hepatic coenzyme A is redistributed in response to mitochondrial acyl-coenzyme A accumulation. *J Nutr* 1992; 122:2094-2100.
- (41) Tubbs PK, Garland PB. Variations in tissue contents of coenzyme A thio esters and possible metabolic implications. *Biochem J* 1964; 93(3):550-557.
- (42) Brass EP, Hoppel CL. Relationship between acid-soluble carnitine and coenzyme A pools in vivo. *Biochem J* 1980; 190(3):495-504.
- (43) Friolet R, Hoppeler H, Krahenbuhl S. Relationship between the coenzyme A and the carnitine pools in human skeletal muscle at rest and after exhaustive exercise under normoxic and acutely hypoxic conditions. *J Clin Invest* 1994; 94(4):1490-1495.
- (44) Corkey BE, Martin-Requero A, Walajtys-Rode E, Williams RJ, Williamson JR. Regulation of the branched chain alpha-ketoacid pathway in liver. *J Biol Chem* 1982; 257(16):9668-9676.
- (45) Williamson JR, Martin-Requero A, Corkey BE, Brandt M, Rothman R. Interactions between a-ketoisovalerate, propionate and fatty acids on gluconeogenesis and ureogenesis in isolated hepatocytes. In: Walser M, Williamson JR, editors. *Metabolism and Clinical implications of Branched Chain Amino and Ketoacids*. Elsevier North Holland, Inc., 1981: 105-117.
- (46) Hertz R, Magenheimer J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 1998; 392(6675):512-516.

- (47) Hertz R, Kalderon B, Byk T et al. Thioesterase activity and acyl-CoA/fatty acid cross-talk of hepatocyte nuclear factor-4{alpha}. *J Biol Chem* 2005; 280(26):24451-24461.
- (48) Folmes CD, Lopaschuk GD. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovasc Res* 2007; 73(2):278-287.
- (49) Roepstorff C, Halberg N, Hillig T et al. Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(1):E133-E142.
- (50) Coude FX, Sweetman L, Nyhan WL. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. *J Clin Invest* 1979; 64(6):1544-1551.
- (51) Gregersen N. The specific inhibition of the pyruvate dehydrogenase complex from pig kidney by propionyl-CoA and isovaleryl-Co-A. *Biochem Med* 1981; 26(1):20-27.
- (52) Hayasaka K, Narisawa K, Satoh T et al. Glycine cleavage system in ketotic hyperglycinemia: a reduction of H-protein activity. *Pediatr Res* 1982; 16(1):5-7.
- (53) Stumpf DA, McAfee J, Parks JK, Eguren L. Propionate inhibition of succinate:CoA ligase (GDP) and the citric acid cycle in mitochondria. *Pediatr Res* 1980; 14:1127-1131.
- (54) Coude FX, Grimber G, Parvy P, Rabier D, Petit F. Inhibition of ureagenesis by valproate in rat hepatocytes. Role of N-acetylglutamate and acetyl-CoA. *Biochem J* 1983; 216(1):233-236.
- (55) Coude FX, Grimber G, Parvy P, Rabier D. Role of N-acetylglutamate and acetyl-CoA in the inhibition of ureagenesis by isovaleric acid in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1983; 761(1):13-16.
- (56) Martin-Requero A, Corkey BE, Cerdan S, Walajtys-Rode E, Parrilla RL, Williamson JR. Interactions between alpha-ketoisovalerate metabolism and the pathways of gluconeogenesis and urea synthesis in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 1983; 258(6):3673-3681.
- (57) Foster DW. The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033:1-16.
- (58) Lahjouji K, Mitchell GA, Qureshi IA. Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol Genet Metab* 2001; 73(4):287-297.

- (59) Harper P, Wadstrom C, Cederblad G. Carnitine measurements in liver, muscle tissue, and blood in normal subjects. *Clin Chem* 1993; 39(4):592-599.
- (60) Brass EP. Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man. *Pharmacol Rev* 2002; 54(4):589-598.
- (61) Cordente AG, Lopez-Vinas E, Vazquez MI et al. Redesign of carnitine acetyltransferase specificity by protein engineering. *J Biol Chem* 2004; 279(32):33899-33908.
- (62) Roe CR, Millington DS, Maltby DA, Kahler SG, Bohan TP. L-carnitine therapy in isovaleric acidemia. *J Clin Invest* 1984; 74(6):2290-2295.
- (63) Van Hove JL, Kahler SG, Millington DS et al. Intravenous L-carnitine and acetyl-L-carnitine in medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency and isovaleric acidemia. *Pediatr Res* 1994; 35(1):96-101.
- (64) Roe CR, Millington DS, Maltby DA, Bohan TP, Hoppel CL. L-carnitine enhances excretion of propionyl coenzyme A as propionylcarnitine in propionic acidemia. *J Clin Invest* 1984; 73(6):1785-1788.
- (65) Lysiak W, Lilly K, DiLisa F, Toth PP, Bieber LL. Quantitation of the effect of L-carnitine on the levels of acid-soluble short-chain acyl-CoA and CoASH in rat heart and liver mitochondria. *J Biol Chem* 1988; 263(3):1151-1156.
- (66) Mawal YR, Qureshi IA. Purification to homogeneity of mitochondrial acyl coa:glycine n-acyltransferase from human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205(2):1373-1379.
- (67) Kolvraa S, Gregersen N. Acyl-CoA:glycine N-acyltransferase: organelle localization and affinity toward straight- and branched-chained acyl-CoA esters in rat liver. *Biochem Med Metab Biol* 1986; 36(1):98-105.
- (68) Nandi DL, Lucas SV, Webster LT, Jr. Benzoyl-coenzyme A:glycine N-acyltransferase and phenylacetyl-coenzyme A:glycine N-acyltransferase from bovine liver mitochondria. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1979; 254(15):7230-7237.
- (69) Mawal Y, Paradis K, Qureshi IA. Developmental profile of mitochondrial glycine N-acyltransferase in human liver. *J Pediatr* 1997; 130(6):1003-1007.
- (70) Batshaw ML, Brusilow S, Waber L et al. Treatment of inborn errors of urea synthesis: activation of alternative pathways of waste nitrogen synthesis and excretion. *N Engl J Med* 1982; 306(23):1387-1392.

- (71) Brusilow SW. Phenylacetylglutamine may replace urea as a vehicle for waste nitrogen excretion. *Pediatr Res* 1991; 29(2):147-150.
- (72) Feoli-Fonseca JC, Lambert M, Mitchell GA et al. Chronic sodium benzoate therapy in children with inborn errors of urea synthesis: effect on carnitine metabolism and ammonia nitrogen removal. *Biochemical and Molecular Medicine* 1996; 57(1):31-36.
- (73) Schlenzig JS, Poggi-Travert F, Laurent J et al. Liver transplantation in two cases of propionic acidemia. *J Inher Metab Dis* 1995; 18(4):448-461.
- (74) Hunt MC, Yamada J, Maltais LJ, Wright MW, Podesta EJ, Alexson SE. A revised nomenclature for mammalian acyl-CoA thioesterases/hydrolases. *J Lipid Res* 2005; 46(9):2029-2032.
- (75) Hunt MC, Alexson SE. The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 2002; 41(2):99-130.
- (76) Hunt MC, Rautanen A, Westin MA, Svensson LT, Alexson SE. Analysis of the mouse and human acyl-CoA thioesterase (ACOT) gene clusters shows that convergent, functional evolution results in a reduced number of human peroxisomal ACOTs. *FASEB J* 2006; 20(11):1855-1864.
- (77) Alexson SEH, Nedergaard J. A novel type of short- and medium-chain acyl-CoA hydrolases in brown adipose tissue mitochondria. *J Biol Chem* 1988; 263:13564-13571.
- (78) Svensson LT, Kilpelainen SH, Hiltunen JK, Alexson SE. Characterization and isolation of enzymes that hydrolyze short-chain acyl-CoA in rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* 1996; 239(2):526-531.
- (79) Yamashita H, Itsuki A, Kimoto M, Hiemori M, Tsuji H. Acetate generation in rat liver mitochondria; acetyl-CoA hydrolase activity is demonstrated by 3-ketoacyl-CoA thiolase. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1761(1):17-23.
- (80) Ramsay RR, Zammit VA. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Mol Aspects Med* 2004; 25(5-6):475-493.
- (81) Treacy E, Clow C, Mamer OA, Scriver CR. Methylmalonic acidemia with a severe chemical but benign clinical phenotype. *J Pediatr* 1993; 122(3):428-429.
- (82) Brown GK, Hunt SM, Scholem R et al. beta-hydroxyisobutyryl coenzyme A deacylase deficiency: a defect in valine metabolism associated with physical malformations. *Pediatrics* 1982; 70(4):532-538.

- (83) Loupatty FJ, Clayton PT, Ruiter JP et al. Mutations in the gene encoding 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase results in progressive infantile neurodegeneration. *Am J Hum Genet* 2007; 80(1):195-199.
- (84) Shimomura Y, Murakami T, Fujitsuka N et al. Purification and partial characterization of 3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase of rat liver. *J Biol Chem* 1994; 269(19):14248-14253.
- (85) Kovachy RJ, Copley SD, Allen RH. Recognition, isolation, and characterization of rat liver D-methylmalonyl coenzyme A hydrolase. *J Biol Chem* 1983; 258(18):11415-11421.
- (86) Saudubray J-M, Charpentier C. Clinical Phenotypes: Diagnosis/Algorithms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill Inc., 2001: 1327-1406.
- (87) Sniderman LC, Lambert M, Giguere R et al. Outcome of individuals with low-moderate methylmalonic aciduria detected through a neonatal screening program. *J Pediatr* 1999; 134(6):675-680.
- (88) Koeberl DD, Young SP, Gregersen NS et al. Rare disorders of metabolism with elevated butyryl- and isobutyryl-carnitine detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *Pediatr Res* 2003; 54(2):219-223.
- (89) Dantas MF, Suormala T, Randolph A et al. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening. *Hum Mutat* 2005; 26(2):164.
- (90) Tortorelli S, Hahn SH, Cowan TM, Brewster TG, Rinaldo P, Matern D. The urinary excretion of glutaryl-carnitine is an informative tool in the biochemical diagnosis of glutaric acidemia type I. *Mol Genet Metab* 2005; 84(2):137-143.
- (91) Mitchell GA, Grompe M, Lambert M, Tanguay RM. Hypertyrosinemia. In: Scriver CS, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 1777-1806.
- (92) Fernandes J, Saudubray J-M, Van Der Berghe G, Walter JH. *Inborn Metabolic Diseases*. 4 ed. Heidelberg: Springer, 2006.
- (93) Kolker S, Sauer SW, Surtees RA, Leonard JV. The aetiology of neurological complications of organic acidaemias--a role for the blood-brain barrier. *J Inher Metab Dis* 2006; 29(6):701-704.
- (94) Hutson SM, Theodore CC, Harper AE. Regulation of leucine and α -ketoisocaproate metabolism in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1978; 253:8126-8133.

- (95) Chakrapani A, Sivakumar P, McKiernan PJ, Leonard JV. Metabolic stroke in methylmalonic acidemia five years after liver transplantation. *J Pediatr* 2002; 140(2):261-263.
- (96) Kasahara M, Horikawa R, Tagawa M et al. Current role of liver transplantation for methylmalonic acidemia: a review of the literature. *Pediatr Transplant* 2006; 10(8):943-947.
- (97) Nyhan WL, Gargus JJ, Boyle K, Selby R, Koch R. Progressive neurologic disability in methylmalonic acidemia despite transplantation of the liver. *Eur J Pediatr* 2002; 161(7):377-379.
- (98) Saudubray JM, Touati G, Delonlay P et al. Liver transplantation in propionic acidemia. *Eur J Pediatr* 1999; 158 Suppl 2:S65-S69.
- (99) Zafeiriou DI, Vargiami E, Mayatepek E, Ugoukidou-Savvopoulou P, Mitchell GA. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase deficiency with reversible white matter changes after treatment. *Pediatr Neurol* 2007; 37(1):47-50.
- (100) Hoffmann GF. Cerebral Organic Acid Disorders and Other Disorders of Lysine Catabolism. In: Fernandes J, Saudubray J-M, Van Der Berghe G, Walter JH, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. Heidelberg: Springer, 2006: 293-306.
- (101) Seijo-Martinez M, Navarro C, Castro del RM et al. L-2-hydroxyglutaric aciduria: clinical, neuroimaging, and neuropathological findings. *Arch Neurol* 2005; 62(4):666-670.
- (102) Lopez-Laso E, Garcia-Villoria J, Martin E, Duque P, Cano A, Ribes A. Classic and late-onset neurological disease in two siblings with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 2007; 30(6):979.
- (103) Thompson GN, Chalmers RA, Walter JH et al. The use of metronidazole in management of methylmalonic and propionic acidemias. *Eur J Pediatr* 1990; 149(11):792-796.
- (104) M.S. Watson, M.Y. Mann, M.A. Lloyd-Puryear, P. Rinaldo, R.R. Howell, Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system, Executive summary. *Genet. Med.* 8 (2006) 1S-11S.

**Chapitre 3 : A liver-specific defect of acyl-CoA degradation produces
hyperammonemia, hypoglycemia and a distinct hepatic
acyl-CoA pattern**

Manuscrit accepté par Plos One

A liver-specific defect of acyl-CoA degradation produces hyperammonemia, hypoglycemia and a distinct hepatic acyl-CoA pattern

Nicolas Gauthier ^{1,2}, Jiang Wei Wu ¹, Shu Pei Wang ¹, Pierre Allard ¹, Orval A Mamer ³, Lawrence Sweetman ⁴, Ann B. Moser ⁵, Lisa Kratz ⁵, Fernando Alvarez ¹, Yves Robitaille ¹, François Lépine ⁶ and Grant A Mitchell ^{1,2}.

¹Centre de Recherche and Département de Pédiatrie (NG, JWW, SPW, PA, FA, GAM) or Département de Pathologie (YR), CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

²Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montréal, Québec, Canada

⁴Institute of Metabolic Disease, Baylor Research Institute, Dallas, Texas, USA

⁵The Hugo W Moser Research Institute, The Kennedy-Krieger Institute, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

⁶INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

To whom correspondence should be addressed:

Grant A Mitchell, M.D.

Medical Genetics Division

Department of Pediatrics
Université de Montréal and
CHU Sainte-Justine
3175 Côte Sainte-Catherine
Montréal, Québec Canada H3T 1C5
Tel: (514) 345 4931
Fax: (514) 345 4766

Keywords:

CASTOR; leucine; ketogenesis; mass spectrometry; 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A; HMG-CoA lyase deficiency

Abstract

Most conditions detected by expanded newborn screening result from deficiency of one of the enzymes that degrade acyl-coenzyme A (CoA) esters in mitochondria. The role of acyl-CoAs in the pathophysiology of these disorders is poorly understood, in part because CoA esters are intracellular and samples are not generally available from human patients. We created a mouse model of one such condition, deficiency of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL), in liver (HLLKO mice). HL catalyses a reaction of ketone body synthesis and of leucine degradation. Chronic HL deficiency and acute crises each produced distinct abnormal liver acyl-CoA patterns, which would not be predictable from levels of urine organic acids and plasma acylcarnitines. In HLLKO hepatocytes, ketogenesis was undetectable. Carboxylation of [2-¹⁴C] pyruvate diminished following incubation of HLLKO hepatocytes with the leucine metabolite 2-ketoisocaproate (KIC). HLLKO mice also had suppression of the normal hyperglycemic response to a systemic pyruvate load, a measure of gluconeogenesis. Hyperammonemia and hypoglycemia, cardinal features of many inborn errors of acyl-CoA metabolism, occurred spontaneously in some HLLKO mice and were inducible by administering KIC. KIC loading also increased levels of several leucine-related acyl-CoAs and reduced acetyl-CoA levels. Ultrastructurally, hepatocyte mitochondria of KIC-treated HLLKO mice show marked swelling. KIC-induced hyperammonemia improved following administration of carglumate (N-carbamyl-L-glutamic acid), which substitutes for the product of

an acetyl-CoA-dependent reaction essential for urea cycle function, demonstrating an acyl-CoA-related mechanism for this complication.

Introduction

Much of the intermediary metabolism of proteins and fatty acids proceeds by the sequential oxidation of acyl-CoAs, and most of the conditions detected by expanded newborn blood screening are caused by deficiency of one of the many intramitochondrial enzymes that normally degrade acyl-CoAs. Examples include methylmalonic, propionic, isovaleric and 3-hydroxy-3-methylglutaric acidemias. Each condition can present a complex and distinct array of manifestations. However, many of these conditions have in common a state of chronic illness with acute and potentially fatal episodes of lethargy, coma, hypoglycemia and hyperammonemia. Key acyl-CoAs, particularly acetyl-CoA, are critical for normal function of the urea cycle (Coude et al., 1979), the Krebs cycle (Jitrapakdee et al., 2008) and for acetylation and regulation of many metabolites and proteins (Zhao et al., 2010).

The potential importance of acyl-CoA esters in inherited metabolic diseases was predicted over 20 years ago (Corkey and Deeney, 1990; Roe and Coates, 1989). However, to directly explore whether abnormal patterns of acyl-CoAs occur in inborn errors of acyl-CoA metabolism and if so, whether they have pathological importance, requires a sensitive, general assay of CoA esters and a suitable biological model with findings similar to those of human patients. Mass spectrometry-based assays, developed for specific acyl-CoAs (Gao et al., 2007; Minkler et al., 2006), could be expanded to a general assay of hepatic acyl-CoAs. Seminal studies in normal rodent hepatocytes showed

rapid transient shifts in acyl-CoA pools following loading with precursor compounds (Corkey et al., 1982; Martin-Requero et al., 1983). Pharmacological studies in mice show that such studies are feasible, including treatment with CoA synthesis inhibitors (Zhang et al., 2007b) and xenobiotic organic acids that form acyl-CoAs (Harris et al., 2011). CoA esters are intracellular, and their measurement requires tissue samples. A small number of case reports in human patients have directly examined acyl-CoA levels in hereditary diseases of acyl-CoA metabolism (Corkey et al., 1988; Lieu et al., 1997). An animal model would provide tissue samples in a controlled fashion.

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) lyase (HL, gene *Hmgcl*, E.C. 4.1.3.4) (Mitchell and Fukao, 2001; Sweetman and Williams, 2001) catalyzes the final step of both leucine degradation and of hepatic ketogenesis from fatty acids (Figure 1). HL-deficient patients appear normal at birth but are subject to severe episodes of hypoglycemic coma. Avoidance of fasting and of very high fat intake, plus moderate limitation of protein intake, helps to prevent such crises. To study whether abnormal liver acyl-CoA metabolism could produce the classical signs of inborn errors of metabolism, and if so, how, we created mice with liver-specific deficiency of HL.

Materials and Methods

Chemicals 3-hydroxybutyrate dehydrogenase and bovine serum albumin were from Roche Diagnostics (Indianapolis, IN). Type 1 collagenase was from Worthington (Lakewood, NJ). The [2-¹⁴C] pyruvate was from Perkin-Elmer (Boston, MA). Other chemicals were from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) except if noted otherwise.

Production of liver-specific HL-deficient mice Construction of the gene targeting vector and targeting in embryonal stem cells are described in Supplemental Information. Targeted embryonal stem cell clones were microinjected into C57BL/6J blastocysts and transferred to pseudopregnant recipients. We obtained 4 chimeras from one clone and 6 from the other. Chimeras were bred to C57BL/6J mice. Agouti offspring were genotyped to identify heterozygotes (HL^{+/-}). In order to obtain the excision in liver of HL exon 2, which is catalytically essential (Puisac et al., 2005), HL heterozygotes (HL^{+/-}) were bred to Alb-Cre mice (B6.Cg-Tg (Alb-cre) 21Mgn/J, 003574, the Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Alb-Cre mice express Cre recombinase from the hepatocyte-specific albumin promoter. HL^{+/-}Cre⁺ mice were crossed to obtain Cre transgenic HL^{L/L} homozygotes (HL^{L/L}Cre⁺; henceforth designated HL liver knockout (HLLKO) mice). Genotyping of normal, targeted and excised *Hmgcl* alleles and of the Cre transgene is described in Supporting Information.

Mouse breeding and care Mice described in this article were obtained by transferring the targeted HL allele to a *C57BL/6J* background for eight generations, then introducing the Alb-Cre allele and interbreeding. Mice were housed with a 12-h light-dark cycle, with the light phase from 6:00 AM to 6:00 PM. They were fed Teklad Mouse Breeder Diet (W) 8626 (Harlan Laboratories, Inc., Madison, WI) containing 20.6% protein and 1.86% leucine (w/w), and 10.4% fat.

At 3-4 weeks of age, mice were genotyped and the results compared with the expected Mendelian ratios. $\text{Cre}^+ \text{HL}^{+/+}$, $\text{Cre}^- \text{HL}^{+/L}$ and $\text{Cre}^- \text{HL}^{L/L}$ littermates served as controls for HLLKO mice. After the discovery of high mortality on a normal diet as described in Results, HLLKO mice and controls were weaned to a modified isocaloric diet containing 6.1% protein (0.55% leucine) and 5.5% fat (TD 90016, Harlan Laboratories, Inc., Madison, WI). Furthermore, glucose was added to the drinking water (10% w/v). All protocols were approved by the CHU Sainte-Justine Animal Care Committee.

Southern, Northern and Western blotting Southern blots were performed as described (Wang et al., 1998) with the following modifications. *HindIII* - *XbaI* double digests were performed on 5µg of genomic DNA. Probes used were an amplified fragment spanning intron 1 residues 799-1130 nt upstream of the acceptor splice site (Figure 2a). Northern (Mitchell et al., 1993) and Western analyses (Ashmarina et al., 1994) were as described.

HL assay HL activity was measured spectrophotometrically as described (Wang et al., 1998).

Hepatocyte isolation Hepatocyte isolation was based on Seglen (Seglen, 1976). Briefly, following anesthesia with sodium pentobarbital, 65 mg/kg, the portal vein was cannulated with a 24 gage 3/4 inch catheter and the vena cava was sectioned. The liver was perfused at 7 mL/min for 5 min with washing buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 282 mM Na₂HPO₄ and 10 mM HEPES) then for 8 min (or sufficient digestion) with digestion buffer, which had the same composition as washing buffer plus 0.33 mg/mL collagenase (Type 1 Worthington Lakewood, NJ) and 1 mg/mL CaCl₂. The liver was then transferred to a Petri dish. The capsule was disrupted. Hepatocytes were suspended in L-15 buffer (Invitrogen, Grand Island, NY) with 0.2% bovine serum albumin, passed through a 74 µm nylon membrane, then centrifuged three times at 50 g for 2 min at 4°C. Cell viability of ≥90% was required for further testing, as evaluated by exclusion of trypan blue (2 g/L in phosphate buffered saline).

Ketogenesis Hepatocytes were suspended at a concentration of 10⁶ cells/mL in Krebs buffer and incubated for 30 min at 37°C in the presence or absence of 2mM octanoate. The reaction was stopped by perchloric acid precipitation (200 µL, 3M) followed by neutralization with 400 µl of 2M KOH / 0.3M MOPS.

The production of acetoacetate from octanoate was assayed spectrophotometrically, as in the HL assay above.

$^{14}\text{CO}_2$ production from [2- ^{14}C] pyruvate. This was assayed as described (Kelleher and Bryan, 1985). Briefly, liver mitochondria were isolated as described (Kelleher and Bryan, 1985), then incubated in the presence or absence of KIC, 4 mM in 3 mL of sucrose (250 mM), glucose (20 mM), 3-hydroxybutyrate (1mM), succinate (20 μM), KHCO_3 (13 mM), MgCl_2 (11 mM), K_2HPO_4 (2 mM), EGTA (0.5 mM) and HEPES (3 mM) pH 7.2, for 30 min at 30°C, then incubated with [2- ^{14}C] pyruvate (8 Ci/mol; final total pyruvate concentration, 52 μM), ATP (1 mM) and hexokinase (1 U/mL) for 30 min at 30°C in a 25 mL Erlenmeyer flask with a center well (Kontes glassware, Vineland, NJ) in a shaking water bath. The reaction was stopped with 0.3 mL HClO_4 20%, by injection of 0.3 mL of methylbenzonium hydroxide into the well to trap $^{14}\text{CO}_2$. Scintillation counting was performed.

KIC challenge testing. This test was performed by injecting KIC, 2 mg/g body weight (15.4 $\mu\text{mol/g}$) intraperitoneally to mice.

Intraperitoneal pyruvate tolerance test. For this test of gluconeogenesis, 4-5 month-old control and HLLKO mice were fasted until blood glucose was <7 mmol/L. Sodium pyruvate, 2 g/kg in saline was injected i.p. The rise of plasma glucose was followed as described (Zhang et al., 2007b).

KIC-induced hyperammonemia and carglumate administration. Two groups of HLLKO mice and controls were studied. In each, intraperitoneal injection of 2 mg/g of KIC was performed, then food was removed and pure water was substituted for 10% glucose. Behaviour and glycemia were assessed at 90 min, 180 min, then every 60 min. If glycemia was <6 mmol/L, 500 μ L of 10% glucose (37°C) were injected intraperitoneally. When lethargy or glycemia <6 mmol/L occurred, plasma ammonia was assayed. In the first group, when plasma ammonia exceeded 200 μ mol/L, carglumate (N-carbamyl-L-glutamic acid, carglumic acid, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, 0.5 mg/g, dissolved in water) was administered by gavage 60 min after the blood draw. Plasma ammonia was measured again 2h after carglumate gavage. For each HLLKO mouse, a paired control was treated in the same fashion.

The second group of HLLKO and control mice were treated similarly except that after the first plasma ammonia >200 μ mol/L, they received a gavage of water only. Plasma ammonia was measured 2 h later. At that point, mice with plasma ammonia >200 μ mol/L received carglumate and were followed as above.

Sources and synthesis of short-chain acyl-CoA standards. Purified acyl-CoAs were commercially-available for several intermediates of leucine degradation (isovaleryl-CoA, 3-methylcrotonyl-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA), the Krebs cycle (acetyl-CoA, succinyl-CoA) and last

stages of fatty acid oxidation (acetoacetyl-CoA, butyryl-CoA), all from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). A deuterated acetyl-CoA was synthesized as follows. Coenzyme A (25 mg, 0.0325 mmol) was added to 2 mL of ice-cold water. D₃-acetic anhydride, 20 μ L (0.23 mmol, CDN Isotopes Inc, Pointe-Claire, Qc) was added with shaking and vortexing. The solution had a pH of approximately 5 at that step. After 20 min at 0°C, another 20 μ L of D₃-acetic anhydride were added, vortexed and the mixture was kept on ice for 30 min. The pH was lowered to ~2 by addition of 10 μ L of formic acid. Analysis was by direct infusion liquid chromatography-quadrupole time of flight (LC-QTOF).

Sample preparation for acyl-CoA profiling Animals were killed by exposure to CO₂ followed by cervical dislocation. The liver was rapidly excised, frozen in liquid nitrogen and then powdered under liquid nitrogen. For each analysis, precisely-measured amounts (between 0.1 to 0.2 g) of powdered tissue were spiked to a final concentration of 20 ppm in a final volume of 100 μ L with the [D₃]acetyl-CoA standard, then homogenized in 2 mL ice-cold 10% trichloroacetic acid with 2 mM DTT using a Polytron (Kinematica Inc, Bohemia, NY). The tubes were vortexed for 5 sec and centrifuged at 4°C for 5 min at 13,000 g. The supernatants were then applied to a 3 cc Oasis HLB solid-phase extraction column (Waters, Milford, MA, USA) preconditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water. The column was then washed with 2 mL of 2 mM DTT in water and eluted with 2 mL of 2 mM DTT in methanol. The eluate was evaporated under a stream of nitrogen, reconstituted in 100 μ L of 2 mM

DTT in water. 20 μ L served for high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) analysis.

HPLC/MS/MS assay of short chain acyl-CoAs. The HPLC/MS/MS system consists of a 2795 Waters HPLC coupled to a Micromass Quattro Premier XE (Milford, MA, USA). The column was a 150 X 3 mm Gemini-NX C18 (5 microns) from Phenomenex (Torrance, CA). Eluent A was 2 mM ammonium acetate in water and eluent B was 2 mM ammonium acetate in acetonitrile. The gradient was 100% A for 5 min, going to 50% B after 30 min, then to 100% B after 31 min, maintained at this composition until 36 min, returning to the initial composition at 37 min and stabilized until 42 min. Flow rate was 0.4 mL/min. The MS was operated in negative ionization electrospray with the following settings: desolvation gas 100 L/Hr; cone gas 10 L/Hr; capillary voltage 2.5 kV; source temperature 120°C; and cone voltage 20 V.

The mass spectrometric data were obtained in multiple reaction monitoring acquisition mode for nine short chain acyl-CoA species using the following transitions (m/z) and collision energies: free CoA (382.5>685.9, 17 V), succinyl-CoA (432.5>685.7, 15 V), isovaleryl-CoA (424.5>769.9, 18 V), HMG-CoA (454.5>382.5, 15 V), acetoacetyl-CoA (424.6>382.4, 11 V), butyryl-CoA (417.7>755.7, 17 V), methylcrotonyl-CoA (423.7>685.7, 20 V), acetyl-CoA (403.6>728, 15 V) and the internal standard [D₃]acetyl-CoA (404.6>730.9, 15 V). The parent and daughter ions and the collision energy used for each acyl-CoA multiple reaction monitoring were determined using pure samples.

Standard curves were constructed for each acyl-CoA using pure molecules. Standard curves were spiked with the internal standard [D₃]acetyl-CoA to compare the relative response factor between each molecule and the standard for the quantification of those short-chain acyl-CoAs in the mouse liver sample.

To identify unknown acyl-CoA species, analyses were performed on a 6224 TOF MS coupled to a 1260 Infinity HPLC system, both from Agilent Technologies Inc. Ionization was performed in negative mode on a dual spray ESI source and mass spectra were acquired from m/z 100 to 3200. Samples were diluted to 50 μ L, then 2 μ L aliquots were injected into the LC-MS system. The chromatographic column was an XBridge C18, 3.5 μ m, 4.6x50 mm from Waters. Elution was performed under a two step gradient using acetonitrile and 10 mM ammonium acetate as mobile phases. Deprotonated species were taken into account for accurate mass calculation.

Hepatic histology and ultrastructure Liver fragments in buffered formalin were paraffin-embedded for hematoxylin and eosin staining and fixed in OCT for Oil Red O staining. Other fragments were fixed in 0.1 M phosphate-buffered 3% glutaraldehyde (pH 7.4) for 2 hours at room temperature, stored in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), then postfixed in 1% OsO₄ for one hour at 4°C, dehydrated in ethanol, and embedded in Epon for electron microscopy.

Results

HLLKO hepatocytes show complete *Hmgcl* gene excision and absence of HL protein and activity.

The targeted, excised *Hmgcl* allele is identified by a 3.6 Kb *HindIII-XbaI* fragment (Figure 2a). This was present in genomic Southern blots of whole liver DNA from HLLKO mice (not shown). A faint 4.9 Kb fragment was also seen in whole liver DNA, consistent with lack of excision in liver cells other than hepatocytes (Matsusue et al., 2003). DNA from isolated HLLKO hepatocytes showed only the 3.6 Kb fragment, consistent with complete excision (Figure 2b). Northern analysis of HLLKO liver extract (Figure 2c) showed an abnormal short HL mRNA, as expected for deletion of exon 2 (60 nt). By immunoblotting, HL protein was undetectable in hepatocyte mitochondria from HLLKO mice but was clearly present in control hepatocytes (Figure 2d). HL activity in HLLKO liver homogenates was 0.32 ± 0.24 nmol acetoacetate/min/mg protein (n=3), at the lower limit of detection and about 100-fold less than in control livers (34.61 ± 9.41 nmol acetoacetate/min/mg protein, n=3; $p < 0.05$).

Spontaneous fatal episodes of lethargy, hypoglycemia and hyperammonemia in HLLKO mice after weaning.

Under standard animal room diet conditions, 24/24 (100%) of HLLKO mice died between 3 and 5 weeks of age (Figure 3a). Genotyping at 1 month

of age revealed the expected Mendelian ratios, suggesting that HLLKO mice had normal viability during pregnancy and suckling. HLLKO mice appeared normal until 1-3 h before death. For each of these spontaneous episodes, henceforth termed "crises" that were detected before death, progressive lethargy occurred over 1-4 hours—and, when measured, hypoglycemia (1.9 ± 0.3 mM (mean \pm SEM); range <0.6 to 3.6 mM; $n=13$; normal, 7.3 ± 0.4 mM, $n=10$) and hyperammonemia (455 ± 139 μ M; 300 to 732 μ M; $n=4$; normal, 94 ± 17 μ M, $n=5$) were present.

Intakes of leucine or leucine metabolites strongly influence the clinical course of HLLKO mice.

The occurrence of crises in HLLKO mice was diminished by feeding them a chow with low protein content (30% that of normal chow) plus adding 10% glucose to their drinking water. With these measures, $>60\%$ of HLLKO mice survived until needed for experiments (Figure 3a). This diet was used in all further experiments.

Conversely, injection of KIC, the transamination product of leucine (2.0 mg/g body mass) provoked fatal crises. Lethargy and unresponsiveness to external stimulation were detectable 1-3 hours after injection ($n=7$), and were associated with hypoglycemia (3.1 ± 0.9 mM, compared to 9.9 ± 1.2 mM in controls, $n=7$, $p<0.001$, Figure 3b). Plasma ammonia levels were normal in nonstressed HLLKO mice (not shown), but elevated in HLLKO mice in crises

($263 \pm 64 \mu\text{M}$; KIC-injected normal controls, $63 \pm 17 \mu\text{M}$, $n=5$, $p<0.05$; Figure 3c).

HL deficiency confined to liver produces metabolite patterns in urine and plasma like those of HL-deficient humans.

Urine organic acids and plasma acylcarnitines were measured in samples from HLLKO mice and controls under non-stressed conditions, following KIC injection, and in samples available from spontaneous crises in HLLKO mice. Urine organic acids showed high variability within groups, but some patterns emerged. Under stable conditions, HLLKO mice had elevated levels of leucine-related metabolites (Table S1). During spontaneous episodes, and following KIC injection, the mean values of most urine leucine metabolites were 4- to 22-fold higher than in nonstressed mice, and 3-hydroxyisovaleric acid was 250-fold greater. In spontaneous crises of HLLKO mice, mean levels of Krebs cycle and fatty acid derivatives were also higher than in controls.

Plasma acylcarnitines under nonstressed conditions were similar in HLLKO and control mice (Table S2). After KIC injection, both HLLKO and control mice showed increases in C5-hydroxylcarnitine. In spontaneous crises, HLLKO mice showed elevated C5-hydroxylcarnitine, and also significant increases in FA-derived acylcarnitines and decreased C4- and C3-acylcarnitines.

Acyl-CoA patterns of HLLKO liver show widespread elevations of leucine-related acyl-CoAs and specific changes following KIC loading.

Each of the acyl-CoA standards was clearly resolved by HPLC. Each of the corresponding endogenous acyl-CoAs was identified in normal liver and easily quantifiable in a single run. After collision-induced dissociation, each acyl-CoA generated an ion at 382 m/z, representing the free CoA moiety cleaved at the thioester bond.

In HLLKO liver from stable nonstressed mice, the main finding was a marked increase of leucine-related acyl-CoAs, including HMG-CoA (Figure 4). In KIC-induced crises, HMG-CoA levels in HLLKO liver were similar to those of non-stressed HLLKO liver, but the levels of other leucine-related acyl-CoAs changed dramatically. Importantly, during spontaneous or KIC-induced crises in HLLKO liver, acetyl-CoA level, which was normal under non-stressed conditions, was two-fold less than normal ($p < 0.01$). Mean succinyl-CoA level was lower under stressed conditions but this did not reach statistical significance. Mean levels of butyryl-CoA (not shown) varied from 1 to 4 nmol/g wet weight in normal and HLLKO livers and were not statistically different under any condition.

The identities of two other acyl-CoAs were studied with LC/TOF-MS. A major species on HPLC-MS/MS had a molecular weight of 867 Da. Biologically-occurring candidates with this molecular mass include succinyl-, methylmalonyl-, 2-methyl-3-hydroxybutyryl- and 3-hydroxyisovaleryl-CoAs. On liquid chromatography, pure samples of succinyl- and methylmalonyl-CoAs

each had different retention times than this peak. The compound had an exact mass of 867.1676 Da on TOF-MS analysis which is compatible with either 3-hydroxyisovaleryl-CoA or 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA. 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA is an isoleucine intermediate that is not commercially available and is not predicted to increase following KIC loading. In contrast, 3-hydroxyisovaleryl-CoA is a byproduct of leucine degradation (Figure 5) and 3-hydroxyisovaleric acid is elevated in the urine of HL-deficient patients (Sweetman and Williams, 2001) and HLLKO mice (Table S1). We therefore designate the observed acyl-CoA peak as 3-hydroxyisovaleryl-CoA. A very small amount of 3-methylglutaconyl-CoA was also detected with LC/TOF-MS (893.14400 Da) although no corresponding peak was found on HPLC-MS/MS analysis.

HLLKO liver shows lack of ketogenesis, low CO₂ production from pyruvate and lack of gluconeogenesis.

In isolated hepatocytes from control mice, acetoacetate production was easily detectable under baseline conditions and was increased during incubation with octanoate (Figure 6a). In contrast, in HLLKO hepatocytes, acetoacetate production was undetectable in either condition. ¹⁴CO₂ production from [2-¹⁴C] pyruvate, a measure of Krebs cycle flux, was reduced in HLLKO mitochondria by incubation with KIC, whereas control liver mitochondria showed no change in response to KIC (Figure 6b). To measure gluconeogenesis *in vivo*, intraperitoneal pyruvate loading was performed. The

expected rapid increase of blood glucose was observed in controls, but no detectable increase in blood glucose occurred in HLLKO mice (Figure 6c).

Hyperammonemia in HLLKO mice improves following carglumate treatment.

Ten of 13 HLLKO mice (77%) entered a crisis after intraperitoneal KIC injection. Each of these 10 mice developed hyperammonemia $>200 \mu\text{mol/L}$ ($p<0.005$ versus matched normal controls). Five hyperammonemic HLLKO mice received carglumate treatment one hour after hyperammonemia was first documented (Figure 7). The plasma ammonia level each HLLKO mouse decreased within two hours following carglumate ($p<0.05$) and in all 5 early-treated HLLKO mice, plasma ammonia was $<200 \mu\text{mol/L}$ by 3 hours after carglumate treatment (not shown). In contrast, in a second group of 5 HLLKO mice that received a sham gavage instead of carglumate, plasma ammonia increased ($p=0.01$) in comparison with treated mice (Figure 7). When these sham-treated HLLKO mice then received carglumate, four hours after the first documentation of hyperammonemia, plasma ammonia decreased to $<200 \mu\text{mol/L}$ within two hours in 4/5 mice ($p<0.05$). The single late-treated non-responder, despite receiving a second dose of carglumate, showed a progressive increase in plasma ammonia and was sacrificed. Neither KIC nor carglumate administration affected plasma ammonia level in control mice.

HLLKO mice have markedly abnormal mitochondrial ultrastructure.

Histologically, control livers and livers from non-stressed HLLKO mice showed large droplets in some periportal hepatocytes and relative sparing of pericentral hepatocytes (Figure S1). In KIC-treated HLLKO liver, droplets tended to be medium-sized and be panlobular in distribution.

By electron microscopy (Figure S2), a high fraction of HLLKO hepatocyte mitochondria were abnormally dilated under nonstressed conditions, compared with normal controls. This was more marked in KIC loaded liver. In KIC-loaded HLLKO liver, dissolution of the mitochondrial matrix and sometimes vacuole formation with extinction of matricial systems was observed. Paracrystalline inclusions, such as described in disorders of the respiratory chain (DiMauro et al., 2006), were not seen.

Peroxisome-related metabolites are normal in HLLKO mice.

Plasma very long chain fatty acids, plasmalogens, cholesterol and sterol synthetic intermediates were similar in HLLKO and normal mice (not shown).

Discussion

HLLKO mice have many features of human inborn errors of acyl-CoA metabolism and show that liver is critical for the development of these signs.

In mice, deficiency of HL confined to liver can produce the cardinal signs of classic inborn errors of acyl-CoA metabolism, namely systemic crises of hypoglycemia, hyperammonemia and coma. Caution must be exercised in drawing specific clinical conclusions from HLLKO mice because of the liver-specificity of HL deficiency of HLLKO mice and the many physiological differences between mice and humans. However, the finding of the same clinical signs as humans with the same enzyme deficiency strongly suggested that HLLKO mice would be useful for understanding the pathophysiology of HL deficiency in a general fashion.

Acyl-CoA levels show characteristic patterns in HLLKO liver.

In HLLKO liver, marked chronic differences occur in total and relative amounts of CoA esters, with major shifts in KIC-induced and spontaneous crises. During crises, HL-deficient liver shows reduced levels of acyl-CoAs such as acetyl-CoA that are essential for normal function and increased levels of leucine-related acyl-CoAs, which are potential inhibitors of acetyl-CoA or succinyl-CoA-dependent reactions.

In HL-deficient liver, leucine degradation is converted from a high capacity linear pathway to a network of interconnected pools. Enzyme reactions that normally are of little importance may become the principle route of leucine elimination in HLLKO liver, allowing carbon skeletons to trickle out at several places (Figure 5).

The relative levels of liver acyl-CoAs, plasma acylcarnitines and urinary free acids differ greatly at different steps of leucine degradation. Presumably this reflects the different properties of the enzymes at each metabolic step. For example, excretion of large amounts of 3-methylglutaconic acid and of the related 3-methylglutaric acid is a major pathway for leucine carbon disposal in HL deficiency. In HLLKO liver, the high level of HMG-CoA is predicted to shift the equilibrium of 3-methylglutaconyl-CoA (3-MGO-CoA) hydratase towards 3-MGO-CoA, but the level of 3-MGO-CoA is very low. Of note, 3-MGO-CoA hydratase possesses hydrolase activity (Mack et al., 2006). We speculate that hydrolysis maintains mitochondrial 3-MGO-CoA at a low level.

Extrahepatic tissues in HLLKO mice are predicted to have a normal capacity for leucine degradation, but this does not prevent the massive urinary excretion of leucine metabolites. This shows that the capacity for renal excretion is similar to or greater than that of nonhepatic tissues to capture and metabolise these compounds.

Acyl-CoA-related mechanisms of hypoketotic hypoglycemia, hyperammonemia and mitochondrial swelling

Hypoglycemia and hyperammonemia, two cardinal metabolic signs of acute crises, have strong potential links to acyl-CoA metabolism (Figure 8).

Pyruvate carboxylase (PC), the first enzyme of gluconeogenesis, is stimulated allosterically by acetyl-CoA (Jitrapakdee et al., 2008; Zeczycki et al., 2010). The K_a for activation of PC by acetyl-CoA is $\sim 140 \mu\text{mol/L}$ (Martin-Requero et al., 1983). High levels of other acyl-CoAs can reduce this effect (Zeczycki et al., 2010) (Figure 8). In this study, acyl-CoA levels were measured in whole tissues, allowing samples to be frozen within seconds after organ removal and increasing the accuracy of measurement by minimizing the risk of post-mortem changes in acyl-CoA levels. The calculated intramitochondrial concentration of HMG-CoA in HLLKO liver, $\sim 300 \mu\text{mol/L}$, exceeds the reported K_i of $140 \mu\text{mol/L}$ for inhibition of acetyl-CoA stimulation of purified chicken liver PC (Barrit, 1985); this doubles the apparent K_a for acetyl-CoA stimulation of PC (Fung, 1971a). The effects of other leucine-related acyl-CoAs on acetyl-CoA-mediated stimulation of PC have not been tested directly but could further reduce the PC activity in HLLKO liver.

Inhibition of PC could explain the lack of increase of blood glucose following pyruvate loading in HLLKO mice. An alternative mechanism of hypoglycemia, which is compatible and synergistic with reduced PC, is reduced production of NADH and ATP. Both of these compounds are used in

gluconeogenesis and the production of adequate amounts of each depends on normal Krebs cycle flux.

Inhibition of pyruvate carboxylase could reduce Krebs cycle flux, consistent with the decrease of pyruvate carboxylation observed in HLLKO mitochondria incubated with KIC. $^{14}\text{CO}_2$ generation from [2- ^{14}C]pyruvate can also be reduced if the pool size of Krebs cycle intermediates is increased, if pyruvate transport into mitochondria is decreased, or if labelled carbon is diverted towards gluconeogenesis from pyruvate or exits the Krebs cycle at other points prior to producing CO_2 . Our results provide no evidence in favour of these mechanisms, and the pyruvate tolerance test gives strong evidence against increased pyruvate carboxylase activity. We cannot formally eliminate the other causes of reduced CO_2 generation. However, acyl-CoA-mediated inhibition of pyruvate carboxylase is consistent with all of our data and provides a unifying explanation for both the lack of increase of blood glucose following pyruvate loading and for the reduction of $^{14}\text{CO}_2$ generation from [2- ^{14}C]pyruvate in KIC-treated mitochondria from HLLKO mice.

In contrast to the high levels of leucine-related metabolites in HLLKO compared to normal liver, in HLLKO liver during crises, changes in free CoA, succinyl-CoA and acetyl-CoA were mild or absent. In KIC-loaded HLLKO liver, free CoA and succinyl-CoA showed trends to reduced levels compared with controls, but this did not reach significance. In contrast, intramitochondrial acetyl-CoA levels, calculated as described (Martin-Requero et al., 1983), were significantly reduced in HLLKO liver following KIC treatment

($p < 0.01$, Figure 4), from $\sim 360 \mu\text{mol/L}$ to $\sim 190 \mu\text{mol/L}$. In purified PC, this level of acetyl-CoA, in the presence of the constantly high level of HMG-CoA found in HLLKO liver, suffices to reduce PC activity (Fung, 1971a), suggesting that reduction of acetyl-CoA may be the critical factor in precipitating hypoglycemia in HLLKO mice.

A chain of events can be traced from the primary metabolic defect to hyperammonemia (Figure 8): gene mutation and enzyme deficiency of HL, abnormal levels of biologically active acyl-CoAs and an acyl-CoA-dependent inhibition of N-acetylglutamate synthase, resulting in hyperammonemia. Of note, N-acetylglutamate synthase is an acetyl-CoA-dependent mitochondrial matrix enzyme that is essential for normal urea cycle function. Its K_m for acetyl-CoA is $600 \mu\text{mol/L}$ (Coude et al., 1979), close to the measured physiological concentration of acetyl-CoA. Although HMG-CoA and related CoA esters were not specifically tested, N-acetylglutamate (NAG) synthase is known to be susceptible to inhibition by other CoA esters (Coude et al., 1979) and pharmacological replacement of the NAG synthase enzyme product by carglumate effectively reduces hyperammonemia in HLLKO mice in crises. The only known biological action of carglumate is as an analogue of N-acetylglutamate. Improvement of hyperammonemia following carglumate has also been reported in human inborn errors of acyl-CoA metabolism (Coude et al., 1979; Levrat et al., 2008). The data strongly support an acyl-CoA-mediated mechanism for the hyperammonemia of HL deficiency and by extension, of other diseases of acyl-CoA metabolism.

Hypoglycemia, hyperammonemia and somnolence occur in many different diseases of acyl-CoA metabolism, each of which is predicted to have different abnormalities of acyl-CoA levels. The marked swelling of HLLKO liver mitochondria, particularly in samples obtained in KIC-induced crises, is similar to observations in methylmalonic acidemia, another disease of acyl-CoA metabolism for which ultrastructural data is available (Chandler et al., 2009). It will be interesting to test whether the acute crises of other inborn errors of acyl-CoA metabolism are characterized by acute reduction of acetyl-CoA and succinyl-CoA levels and by an increase in the concentration of other, potentially toxic CoAs. The properties of the other acyl-CoAs and of the metabolites which arise from them, accumulation of which is predicted to be different in each disease, may account for the clinical differences among these conditions.

KIC-induced and spontaneous crises may arise by different pathways

HLLKO mice in spontaneous crises had evidence of increased fatty acid oxidation, including increases of dicarboxylic acids in urine (Table S1) and of long chain fatty acylcarnitines in plasma (Table S2). Spontaneous crises presumably develop over a longer period than the 1-4 hours required for the development of crises following acute KIC loading. This longer pre-crisis phase would permit activation of adipocyte lipolysis and liver fatty acid oxidation. Interestingly, in HL-deficient human patients, different sources of

HMG-CoA have been implicated during infections, in which protein catabolism predominates, and fasting, in which non-protein sources like fatty acids play a larger role (Thompson et al., 1990).

Liver HL deficiency does not affect peroxisomal function tests

HL has targeting signals for mitochondria and for peroxisomes on its N- and C-termini, respectively and about 6% of mouse liver HL is peroxisomal (Ashmarina et al., 1994). The function of peroxisomal HL is unknown. In HLLKO mice, metabolites of peroxisomal beta oxidation and of the synthesis of plasmalogens and sterols were normal, showing that liver peroxisomal HL is not essential for these functions. Peroxisomes play major roles in lipid-rich tissues like brain, adrenal and testes. Since HLLKO mice only lack HL in hepatocytes, a role for peroxisomal HL cannot be eliminated in other tissues.

HLLKO mice provide support for acyl-CoA-mediated pathogenesis

In inborn errors of acyl-CoA metabolism, the high concentrations of CoA esters are predicted to be the first step of the metabolic cascades from which all clinical manifestations arise. The acronym “CASTOR” has been applied to the state of coenzyme A sequestration, toxicity and/or redistribution predicted to occur in hereditary and acquired disorders of acyl-CoA metabolism (Mitchell et al., 2008). HLLKO mice permitted the first direct, controlled study of the CASTOR hypothesis. They confirm central predictions of the CASTOR hypothesis in an inborn error of acyl-CoA metabolism: they demonstrate

chronically abnormal levels of tissue acyl-CoAs, which intensify during stress, and provide the most complete evidence to date for a direct role of acyl-CoAs in the cardinal signs of hypoglycemia and hyperammonemia common to many inborn errors of acyl-CoA metabolism.

Note added in proof: During revision of this article, a publication describing another technique for tissue acyl-CoA profiling came to our attention (Palladino et al., 2012).

Supporting Information

Figure S1. Liver histology of HLLKO and control mice. (a) normal control; (b) HLLKO; (c) normal control 6 h after KIC injection and (d) HLLKO liver after KIC injection. (a-c) show moderate steatosis with large lipid droplets predominantly in a periportal location and relative sparing of pericentral hepatocytes. In (d), a panlobular distribution of medium-sized droplets is seen. All slides show hematoxylin and eosin staining, X200

Figure S2. HLLKO hepatocytes have marked abnormalities of mitochondrial ultrastructure. (a) normal mitochondria in control hepatocytes following KIC injection. (b) HLLKO hepatocyte, nonstressed conditions, showing matrix swelling in some mitochondria. (c) HLLKO hepatocyte after KIC injection. Most mitochondria show severe hydropic swelling.

Table S1. Selected urinary organic acids related to Krebs cycle, fatty acid and leucine metabolism. Values shown are mean \pm SEM; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ compared to control ; § $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$ compared to HLLKO stable

Table S2. Plasma acylcarnitine levels in HLLKO mice and controls. Values shown are mean \pm SEM; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ compared to control stable ; § $p \leq 0.05$; §§ $p \leq 0.01$; §§§ $p \leq 0.001$ compared to HLLKO stable ; † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$ compared to control KIC.

TEXT S1 Supporting Materials and Methods.

Acknowledgements

We thank Sylvain Milot and Josée-Marie Dubé for excellent technical assistance and Blandine Comte, Nathalie Patey and Kim Bartlett for thoughtful discussions.

Figure Legends

Figure 1. Two metabolic pathways lead to mitochondrial HMG-CoA.

Leucine and its metabolite KIC are degraded entirely via HMG-CoA. In hepatic ketogenesis from fatty acid oxidation, a variable fraction of the flux is directed towards HMG-CoA, in response to physiological demands for ketone bodies.

Figure 2. Successful targeting of the HL gene, liver-specific gene excision and liver HL deficiency.

(a) The upper diagram shows the introduction of a neomycin construct between exons 1 and 2. Two LoxP sequences are inserted, 5' to the neomycin construct and after exon 2. The lower panel demonstrates the sizes of diagnostic restriction fragments in the normal gene, the floxed targeted allele and the allele following Cre-mediated excision. Fragments are generated by *HindIII-XbaI* double digestion. (b) Genomic Southern blot to detect targeting of the HL locus in mouse hepatocytes. Genotypes and molecular weights are indicated. (c) Northern blot of liver RNA using the HL cDNA probe. Each lane contains 10µg of liver RNA. (d) Western blot analysis of liver mitochondrial HL. In each lane, 10µg of protein is present.

Figure 3. Fatal hypoglycemic, hyperammonemic coma in HLLKO mice.

(a) Survival curves of the HLLKO mice with and without the modified diet are

compared to a control group. HLLKO without diet, n=24; HLLKO with diet, n=25; controls, n=25. (b and c) KIC injection causes hypoglycemic, hyperammonemic episodes in HLLKO mice. Mice received an injection of KIC, 2 mg/g and were tested at the onset of crises, which occurred 1-4 hours later. Mice were paired with for age- and sex-matched controls and were 3-8 months old. (b) Blood glucose levels of HLLKO and control mice before and during crises, n=7. (c) Blood NH₄ levels of HLLKO and control mice during crises., n=5. Unfilled bars, controls; filled, HLLKO.

Figure 4. Liver short-chain acyl-CoA patterns in normal and HLLKO liver. Stable and KIC-injected mice (n=5) were paired with age- and sex-matched controls. Four mice in spontaneous crises were also studied. Acyl-CoA levels are shown as nmol/g liver (wet weight). Unfilled bars, controls; filled, HLLKO.

Figure 5. Patterns of leucine-related liver acyl-CoAs and urine and plasma metabolites. The intermediates of leucine degradation are shown on the left. The metabolic block at HL is shown. Related urine and plasma metabolites are shown on the right. The number of arrowheads reflects the magnitude of increase with respect to normal, nonstressed control mice for HLLKO mice under normal conditions (unfilled arrows) and during decompensations filled arrows: 1 arrowhead, 3 to <9-fold increase; 2, 9-<27X; 3, 27-<81X; 4, >81X. Abbreviations, IVA-CoA, isovaleryl-CoA; 3-MC-CoA: 3-

methylocrotonyl-CoA; 3-MGO-CoA, 3-methylglutaconyl-CoA; 3-OH-IVA-CoA, 3-hydroxyisovaleryl-CoA; C5OH-carn: C5 hydroxycarnitine; 3-OH-IVA, 3-hydroxyisovaleric acid; 3-MC-gly, 3-methylocrotonylglycine; 3-MGO, 3-methylglutaconic acid; 3-MG, 3-methylglutaric acid. NA, not available (see text).

Figure 6. HLLKO mice show suppression of ketogenesis, Krebs cycle flux and gluconeogenesis. (a) Ketogenesis from octanoate is undetectable in HLLKO hepatocytes but is abundant in control hepatocytes. Hepatocytes (10^6 /mL) were suspended in Krebs buffer with the indicated concentration of octanoate, then incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped and acetoacetate was measured. Three experiments were performed for each genotype. Unfilled bars, controls; filled, HLLKO. (b) Pre-incubation with KIC reduces Krebs cycle flux in HLLKO hepatic mitochondria. Krebs cycle flux is measured as $^{14}\text{CO}_2$ production from $[2\text{-}^{14}\text{C}]\text{pyruvate}$ in isolated liver mitochondria. The effect of KIC incubation was expressed as the fraction of $^{14}\text{CO}_2$ generation in KIC-incubated mitochondria compared to mitochondria incubated without KIC. Controls, n=5; HLLKO, n=3. Unfilled bars, controls; filled, HLLKO. (c) HLLKO mice show no detectable gluconeogenesis following pyruvate administration. 4-month-old mice were fasted until blood glucose was $<6\text{mmol/L}$ (11-17 hours), then received injections of 2 g/kg pyruvate i.p. Controls, n=8; HLLKO, n=3

Figure 7. Carglumate treatment corrects hyperammonemia in HLLKO mice. T0 indicates the time at which hyperammonemia $<200 \mu\text{mol/L}$ was first demonstrated (see text). T1 and T4 indicate the times of administration, 1h and 4h respectively after T0, for early or late treatment with carglumate. Late treated mice and their controls received a sham gavage at 1h. Each group contained 5 mice aged 2-8 months; controls were matched for age and sex with HLLKO mice. ■, normal, early treatment (n=5; 2-8 month-old mice); ▲, HLLKO, early treatment (n=5; 2-8 months); ▼, normal, sham and late treatment (n=5; 3-7 months); ◆, HLLKO, sham and late treatment (n=5; 3-7 months). ** HLLKO early vs HLLKO late, $p \leq 0.01$

Figure 8. In HLLKO liver, acyl-CoAs play a crucial role in acute hypoglycemia and hyperammonemia. Acetyl-CoA is a critical point of convergence of glucose, fat and amino acid metabolism. Hypoglycemia can be caused by at least two mechanisms related to low level of acetyl-CoA and abnormally high levels of other acyl-CoAs: lack of NADH and ATP production that normally power glucose synthesis, and lack of activation of pyruvate carboxylase (PC) (Wimhurst and Manchester, 1970). Hyperammonemia can arise if a low level of acetyl-CoA will reduce the synthesis of N-acetylglutamate (NAG), which is essential for the urea cycle. Use of carglumate, a pharmacological substitute for NAG, reduces the hyperammonemia of acute crises. NADH and ATP-requiring steps of

gluconeogenesis not discussed specifically are shown by dotted lines. Other abbreviations, KC, Krebs cycle; NADH, reduced nicotine adenine dinucleotide; oxa, oxaloacetate; PEP, phospho-*enol*-pyruvate; Pyr, pyruvate; RC, respiratory chain.

REFERENCES

1. Coude FX, Sweetman L, Nyhan WL (1979) Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. *J Clin Invest* 64: 1544-1551.
2. Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, et al. (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 413: 369-387.
3. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, et al. (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327: 1000-1004.
4. Roe C, Coates PM (1989) Acyl-CoA dehydrogenase deficiencies. In: Scriver CS, Baudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., et al., editor. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 6th ed: McGraw-Hill. pp. 889-914.
5. Corkey BE, Deeney JT (1990) Acyl CoA regulation of metabolism and signal transduction. *Prog Clin Biol Res* 321: 217-232.
6. Minkler PE, Kerner J, Kasumov T, Parland W, Hoppel CL (2006) Quantification of malonyl-coenzyme A in tissue specimens by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 352: 24-32.
7. Gao L, Chiou W, Tang H, Cheng X, Camp HS, et al. (2007) Simultaneous quantification of malonyl-CoA and several other short-chain acyl-CoAs in animal tissues by ion-pairing reversed-phase HPLC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 853: 303-313.
8. Corkey BE, Martin-Requero A, Walajtys-Rode E, Williams RJ, Williamson JR (1982) Regulation of the branched chain alpha-ketoacid pathway in liver. *J Biol Chem* 257: 9668-9676.
9. Martin-Requero A, Corkey BE, Cerdan S, Walajtys-Rode E, Parrilla RL, et al. (1983) Interactions between alpha-ketoisovalerate metabolism and the pathways of gluconeogenesis and urea synthesis in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 258: 3673-3681.
10. Zhang YM, Chohnan S, Virga KG, Stevens RD, Ilkayeva OR, et al. (2007) Chemical knockout of pantothenate kinase reveals the metabolic and genetic program responsible for hepatic coenzyme A homeostasis. *Chem Biol* 14: 291-302.
11. Harris SR, Zhang GF, Sadhukhan S, Murphy AM, Tomcik KA, et al. (2011) Metabolism of levulinate in perfused rat livers and live rats: conversion to the drug of abuse 4-hydroxypentanoate. *J Biol Chem* 286: 5895-5904.
12. Corkey BE, Hale DE, Glennon MC, Kelley RI, Coates PM, et al. (1988) Relationship between unusual hepatic acyl coenzyme A profiles and the pathogenesis of Reye syndrome. *J Clin Invest* 82: 782-788.
13. Lieu YK, Hsu BY, Price WA, Corkey BE, Stanley CA (1997) Carnitine effects on coenzyme A profiles in rat liver with hypoglycin inhibition of multiple dehydrogenases. *Am J Physiol* 272: E359-366.
14. Sweetman L, Williams JC (2001) Branched Chain Organic Aciduria. In: Scriver CS, Baudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., et al., editor. *The*

Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease: McGraw-Hill. pp. 2125-2163.

15. Mitchell GA, Fukao T (2001) Inborn errors of ketone body metabolism. In: Scriver CS, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, et al., editor. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed: McGraw-Hill pp. 2327 - 2356.
16. Puisac B, Lopez-Vinas E, Moreno S, Mir C, Perez-Cerda C, et al. (2005) Skipping of exon 2 and exons 2 plus 3 of HMG-CoA lyase (HL) gene produces the loss of beta sheets 1 and 2 in the recently proposed (beta-alpha)₈ TIM barrel model of HL. *Biophys Chem* 115: 241-245.
17. Wang SP, Marth JD, Oligny LL, Vachon M, Robert MF, et al. (1998) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL): gene targeting causes prenatal lethality in HL-deficient mice. *Hum Mol Genet* 7: 2057-2062.
18. Mitchell GA, Robert MF, Hruz PW, Wang S, Fontaine G, et al. (1993) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL). Cloning of human and chicken liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *J Biol Chem* 268: 4376-4381.
19. Ashmarina LI, Rusnak N, Miziorko HM, Mitchell GA (1994) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase is present in mouse and human liver peroxisomes. *J Biol Chem* 269: 31929-31932.
20. Seglen PO (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13: 29-83.
21. Kelleher JK, Bryan BM, 3rd (1985) A ¹⁴CO₂ ratios method for detecting pyruvate carboxylation. *Anal Biochem* 151: 55-62.
22. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, et al. (2003) Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 111: 737-747.
23. DiMauro S, Hirano M, Schon E (2006) Mitochondrial medicine: Informa healthcare. 348 p.
24. Mack M, Schniegler-Mattox U, Peters V, Hoffmann GF, Liesert M, et al. (2006) Biochemical characterization of human 3-methylglutaconyl-CoA hydratase and its role in leucine metabolism. *FEBS J* 273: 2012-2022.
25. Zeczycki TN, Maurice MS, Attwood PV (2010) Inhibitors of Pyruvate Carboxylase. *Open Enzym Inhib J* 3: 8-26.
26. Barrit GJ (1985) Regulation of enzymatic activity. In: Keech DB, Wallace JC, editors. Pyruvate Carboxylase. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 179-248.
27. Fung C-H (1971) The regulatory properties and reaction mechanism of chicken liver pyruvate carboxylase (Ph.D. Thesis). Cleveland: Case Western Reserve University.
28. Levrat V, Forest I, Fouilhoux A, Acquaviva C, Vianey-Saban C, et al. (2008) Carglumic acid: an additional therapy in the treatment of organic acidurias with hyperammonemia? *Orphanet J Rare Dis* 3: 2.
29. Chandler RJ, Zervas PM, Shanske S, Sloan J, Hoffmann V, et al. (2009) Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. *FASEB J* 23: 1252-1261.

30. Thompson GN, Chalmers RA, Halliday D (1990) The contribution of protein catabolism to metabolic decompensation in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Eur J Pediatr* 149: 346-350.
31. Mitchell GA, Gauthier N, Lesimple A, Wang SP, Mamer O, et al. (2008) Hereditary and acquired diseases of acyl-coenzyme A metabolism. *Mol Genet Metab* 94: 4-15.
32. Palladino AA, Chen J, Kallish S, Stanley CA, Bennett MJ (2012) Measurement of tissue acyl-CoAs using flow-injection tandem mass spectrometry: acyl-CoA profiles in short-chain fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab* 107: 679-683.
33. Wimbhurst JM, Manchester KL (1970) Some aspects of the kinetics of rat liver pyruvate carboxylase. *Biochem J* 120: 79-93.

Figure 1

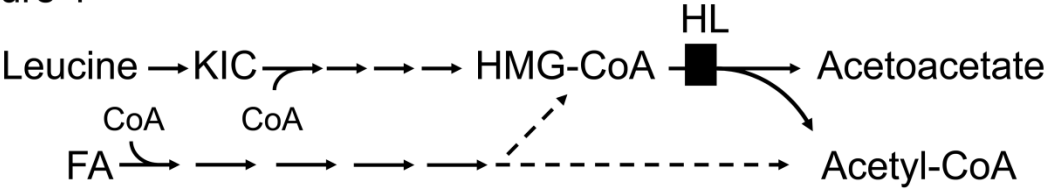


Figure 2

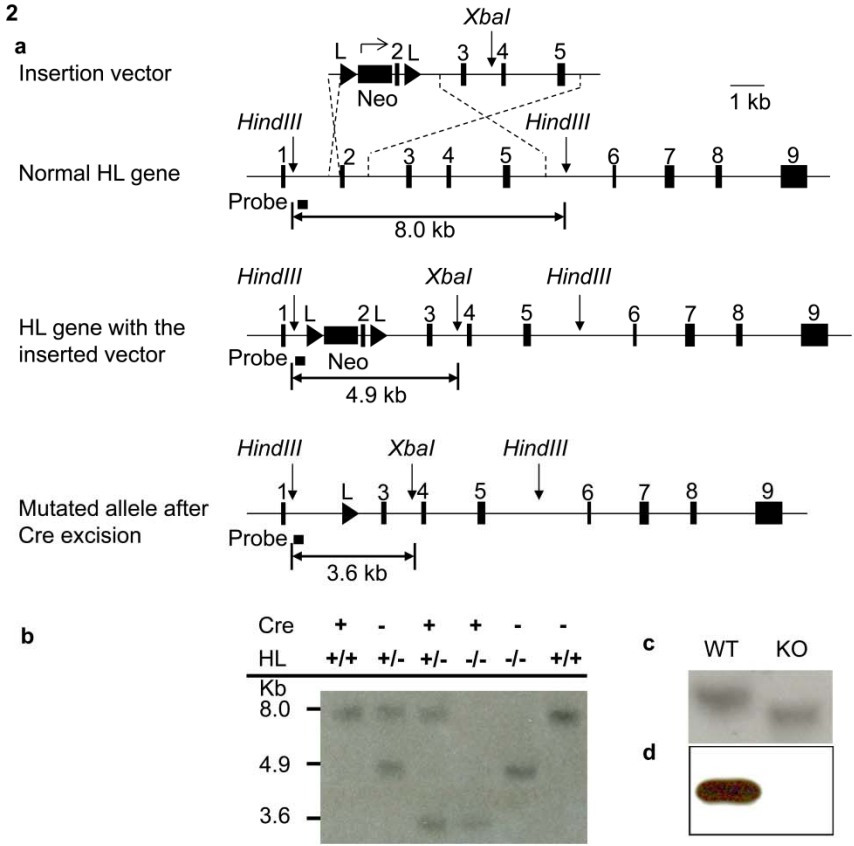


Figure 3

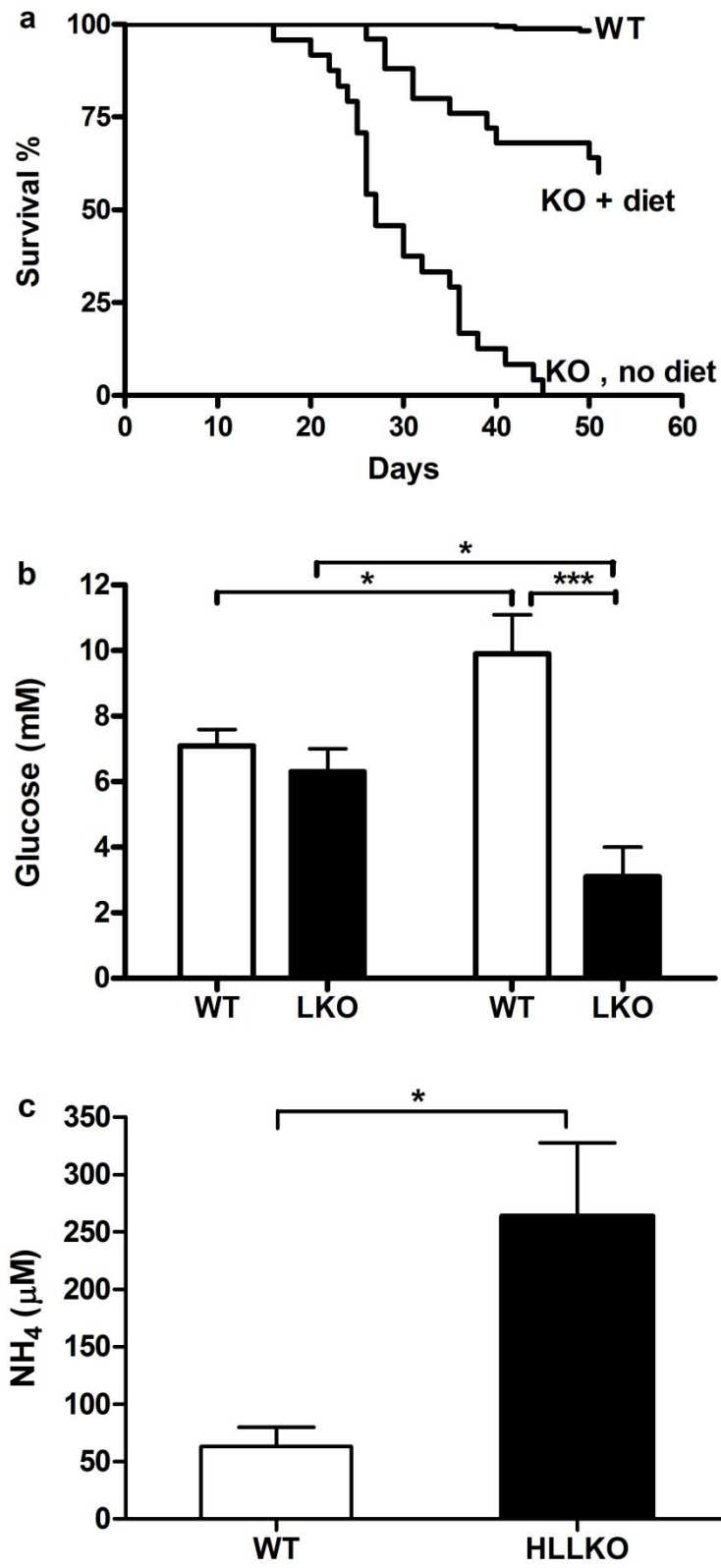


Figure 4

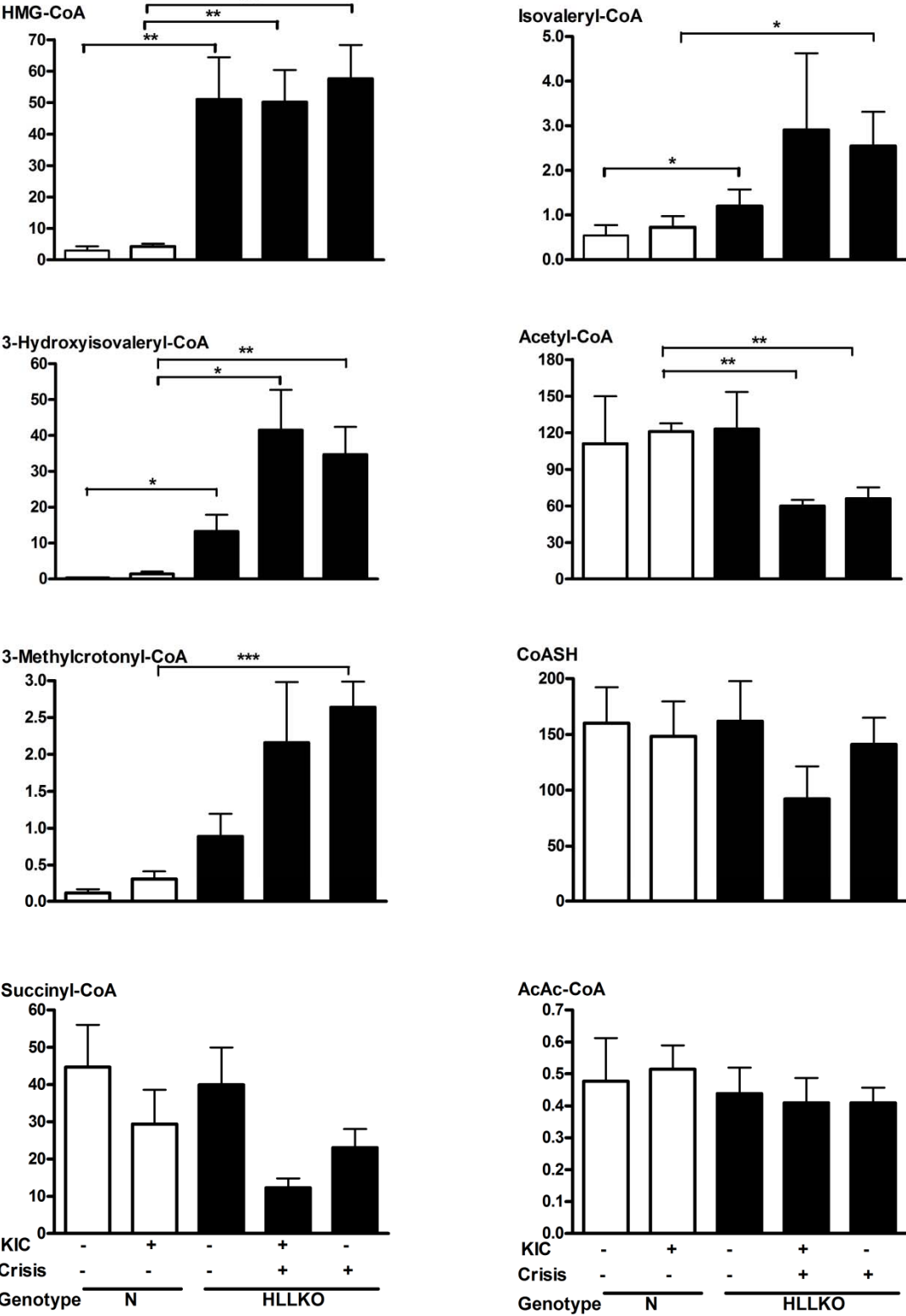


Figure 5

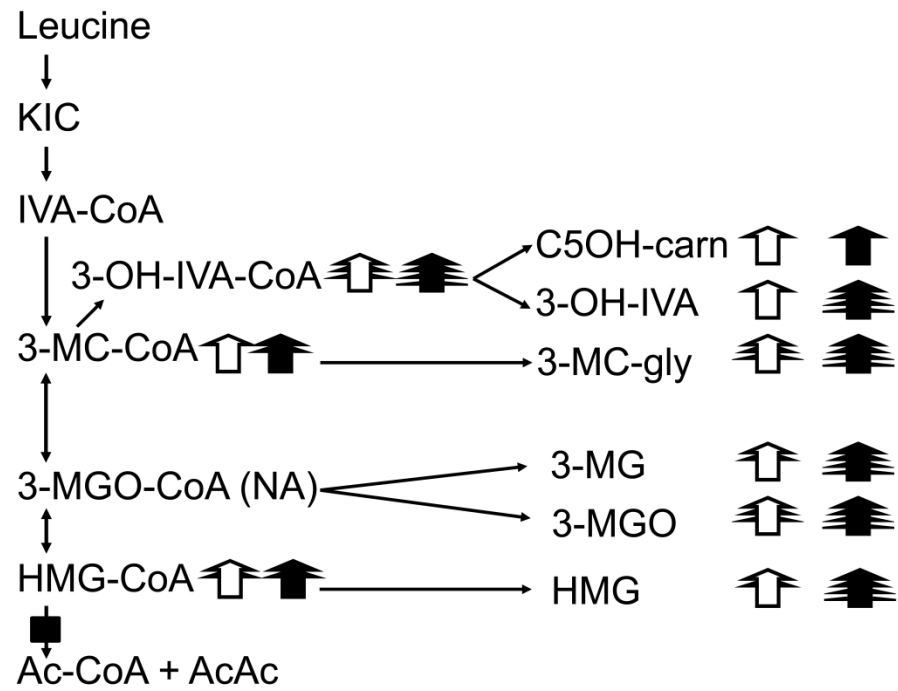


Figure 6

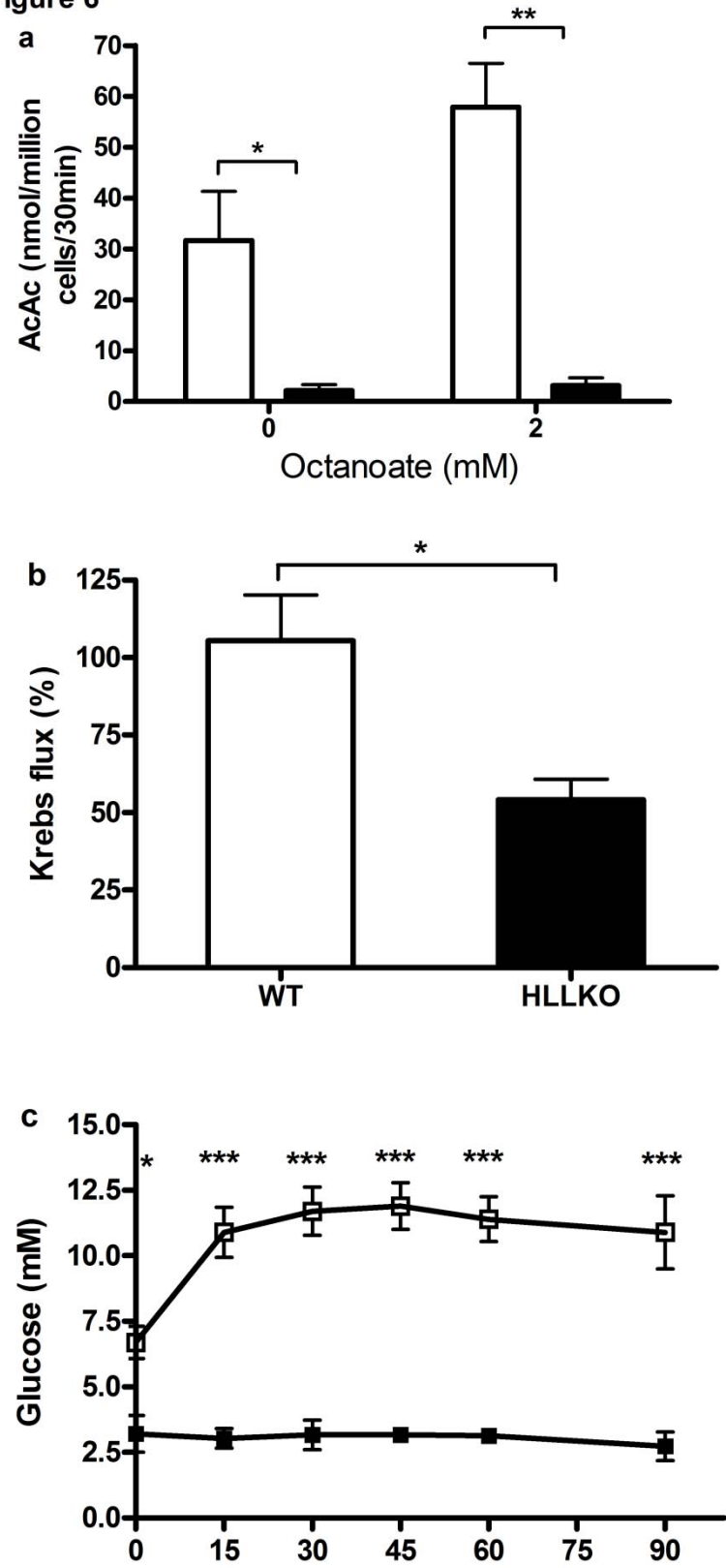


Figure 7

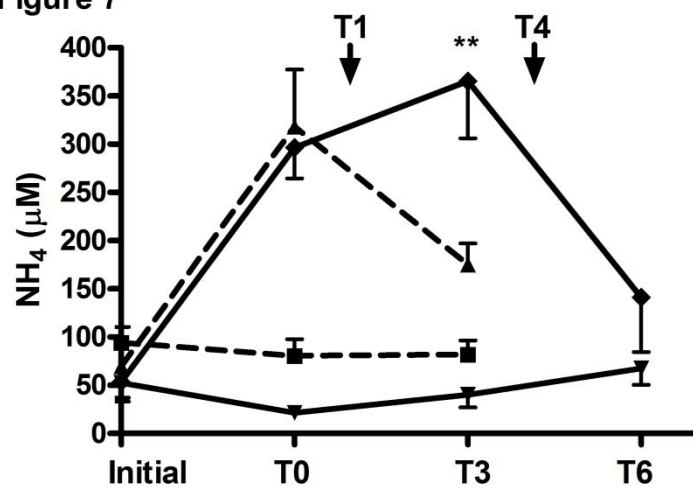
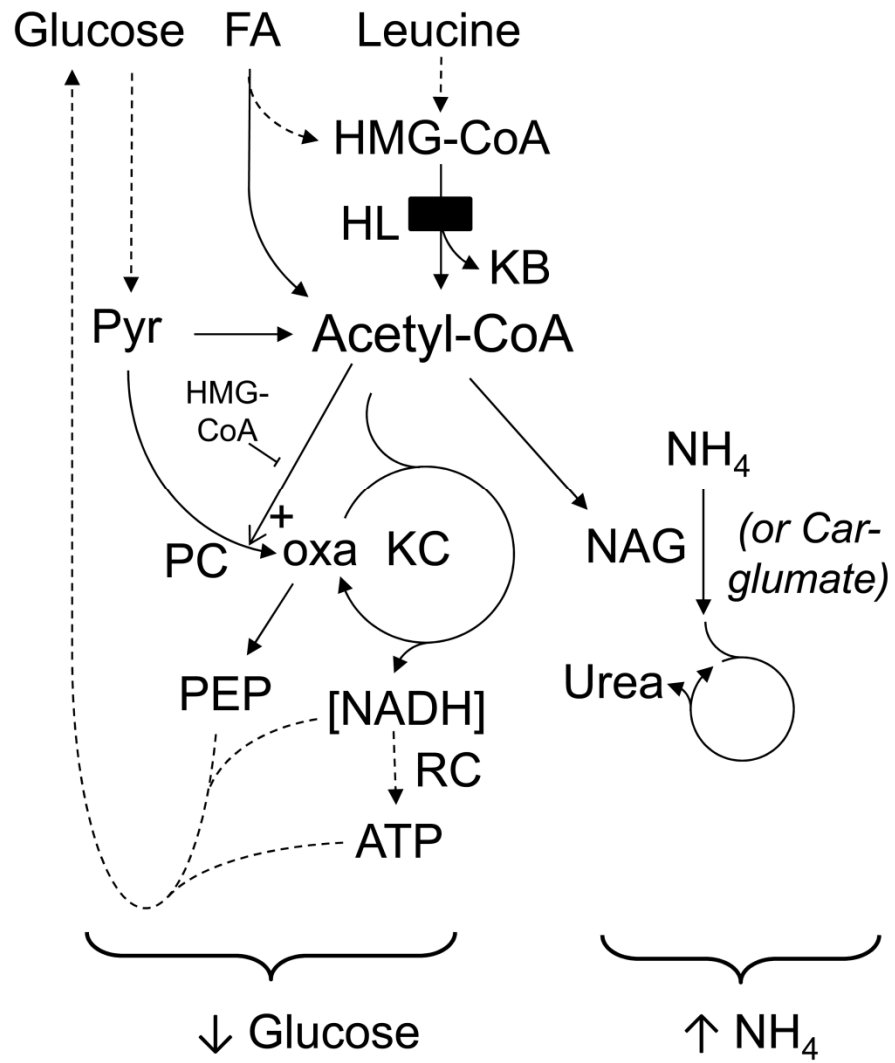


Figure 8



SUPPORTING INFORMATION

A liver-specific defect of acyl-CoA degradation produces hyperammonemia, hypoglycemia and a distinct hepatic acyl-CoA pattern.

Nicolas Gauthier ^{1,2}, Jiang Wei Wu ¹, Shu Pei Wang ¹, Pierre Allard ¹, Orval A Mamer ³, Lawrence Sweetman ⁴, Ann B. Moser ⁵, Lisa Kratz ⁵, Fernando Alvarez¹, Yves Robitaille¹, François Lépine⁶ and Grant A Mitchell ^{1,2}.

¹Centre de Recherche and Département de Pédiatrie (NG, JWW, SPW, PA, FA, GAM) or Département de Pathologie (YR), CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, Canada

²Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada

³Goodman Cancer Research Centre, McGill University, Montréal, Canada

⁴Institute of Metabolic Disease, Baylor Research Institute, Dallas, TX, USA

⁵ The Hugo W Moser Research Institute, The Kennedy-Krieger Institute, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland

⁶INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Canada

* Running title: *Acyl-CoAs and Liver Disease in Mice*

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Targeting Vector Construction. For the conditional targeting vector for HL, we chose to excise exon 2 of the mouse *Hmgcl* gene. This exon contains several catalytically-essential residues (Mitchell et al., 1998). To create the insertion vector shown in Figure 1a, a DNA fragment containing the neomycin resistance gene and 129Sv/J mouse HL exon 2 flanked by Lox sites, was inserted into a 129 Sv/J genomic clone. A thymidine kinase gene with a phosphoglycerate kinase promoter (not shown in the figure) was inserted upstream of the short arm.

***Hmgcl* gene targeting and genotyping of the targeted HL allele** Targeting of *Hmgcl* was performed in J1 embryonic stem cells as described (Sirois et al., 2006). Neomycin-resistant, thymidine-sensitive colonies were studied. Cells were washed with phosphate buffered saline. Lysates were digested with proteinase K, and then heated at 95°C for 6 min to inactivate Proteinase K. 20% of the lysate was used directly for PCR amplification. The sense primer HLM28 (5'-CCGTTCGCTTCAAATCAGGC-3'), which is outside of the targeting vector, corresponds to residues -1054 to -1034 nt 5' of exon 2. The sequences of antisense primer Neo-I and PCR conditions were as described previously (Wang et al., 1998). The diagnostic 1.3 kb amplicon indicated the

targeted allele. It was present in three of 96 clones (3.2%). The targeted ES cell clones were confirmed by Southern blotting as follows. ES cell genomic DNA (5 µg) was digested with both *Hind*III and *Xba* I and probed with an amplified 330 nt fragment located outside the targeting vector and corresponding to residues 799-1130 nt upstream from the acceptor splice site of exon 2. The probe detects 3.8 kb (normal) and 4.9 kb (targeted) fragments. Southern blotting was performed as described previously (Wang et al., 1998).

Genotyping of HL^L and Cre^+ alleles PCR reactions for genotyping normal (+/+), targeted (L/L) and heterozygous (+/L) mice were performed with 3 primers: HLM 65 (sense primer, 5'-GAGCACAGCTTCCTTGCTTA-3', corresponding to residues -160 to -180 nt upstream of exon 2), HLM 66 (antisense primer, 5'-ACAGTCTTGAGCCACTTGATAT-3', residues +145 to +165 nt downstream of exon 2) and the antisense primer *Neo1* (Wang et al., 1998) PCR conditions were described (Wang et al., 1998) except that cycles were as follows : 94°C, 45 sec; 55°C, 45 sec; 72°C, 30 sec for 35 cycles with a final 10 min at 72°C then 4°C.

Amplification to detect the Cre transgene was carried out with Cre-1 (5'-GATGGACATGTTTCAGGGATC-3' a sense primer spanning Cre cDNA positions 80 to 100-nt with respect to the A residue of the initiation ATG codon) and Cre-2 (5'-AGCTTGCATGATCTCCGGTA-3', an antisense primer spanning Cre cDNA residues 916 to 936). Cycles were as follows : 94°C, 45

sec; 60°C, 45 sec; 72°C, 1 m 30 sec for 30 cycles with a final 10 min at 72°C then 4°C.

Supplemental Figures

Figure S1. Liver histology of HLLKO and control mice. (a) normal control; (b) HLLKO; (c) normal control 6 h after KIC injection and (d) HLLKO liver after KIC injection. (a-c) show moderate steatosis with large lipid droplets predominantly in a periportal location and relative sparing of pericentral hepatocytes. In (d), a panlobular distribution of medium-sized droplets is seen. All slides show hematoxylin and eosin staining, X200

Figure S2. HLLKO hepatocytes have marked abnormalities of mitochondrial ultrastructure. (a) normal mitochondria in control hepatocytes following KIC injection. (b) HLLKO hepatocyte, nonstressed conditions, showing matrix swelling in some mitochondria. (c) HLLKO hepatocyte after KIC injection. Most mitochondria show severe hydropic swelling.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Mitchell GA, Ozand PT, Robert MF, Ashmarina L, Roberts J, et al. (1998) HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *Am J Hum Genet* 62: 295-300.
2. Sirois J, Cote JF, Charest A, Uetani N, Bourdeau A, et al. (2006) Essential function of PTP-PEST during mouse embryonic vascularization, mesenchyme formation, neurogenesis and early liver development. *Mech Dev* 123: 869-880.
3. Wang SP, Marth JD, Oligny LL, Vachon M, Robert MF, et al. (1998) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL): gene targeting causes prenatal lethality in HL-deficient mice. *Hum Mol Genet* 7: 2057-2062.

Table SI. Selected urinary organic acids related to Krebs cycle, fatty acid and leucine metabolism.

| | CONTROL | HLLKO STABLE | HLLKO CRISIS |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| n | 10 | 9 | 3 |
| Lactic | 1618.2 ± 1014.3 | 1412.0 ± 1162.2 | 5958.3 ± 5741.5 |
| Citric | 4656.7 ± 2746.6 | 5578.2 ± 1918.2 | 25567.3 ± 12650.2 |
| 2-Ketoglutaric | 468.0 ± 307.0 | 205.3 ± 150.0 | 1920.0 ± 1648.0 |
| Succinic | 254.5 ± 81.1 | 385.3 ± 108.9 | 955.7 ± 274.4 |
| Fumaric | 7.8 ± 4.1 | 13.1 ± 7.1 | 119.3 ± 57.3 |
| Malic | 37.0 ± 22.2 | 111.4 ± 42.8 | 808.0 ± 418.7 |
| Ethylmalonic | 12.4 ± 3.2 | 7.6 ± 1.7 | 33.7 ± 2.7**§§ |
| Methylsuccinic | 11.8 ± 2.2 | 7.1 ± 1.9 | 19.0 ± 5.5 |
| Adipic | 33.8 ± 9.7 | 25.4 ± 22.3 | 624.7 ± 185.8 |
| Suberic | 1.1 ± 0.5 | 3.6 ± 3.6 | 116.0 ± 40.5 |
| Sebacic | 0.0 ± 0.0 | 0.1 ± 0.1 | 30.7 ± 6.4*§ |
| 3-Hydroxysebacic | 0.3 ± 0.2 | 1.7 ± 1.6 | 131.7 ± 101.8 |
| Hexanoylglycine | 5.7 ± 1.4 | 5.9 ± 1.1 | 12.7 ± 4.3 |
| 3-Hydroxyisovaleric | 3.8 ± 2.2 | 2.2 ± 1.6 | 583.7 ± 228.8 |
| Isovalerylglycine | 20.2 ± 7.2 | 30.3 ± 13.2 | 8.7 ± 2.33 |
| 3-Methylglutaconic | 40.4 ± 27.1 | 716.9 ± 237.2* | 3792.3 ± 700.7*§ |
| 3-Methylglutaric | 0.7 ± 0.7 | 19.3 ± 6.3* | 68.0 ± 31.6 |
| 3-Methylcrotonylglycine | 0.2 ± 0.2 | 21.2 ± 7.2* | 131.0 ± 49.5 |
| 3-Hydroxy-3-Methylglutaric | 20.9 ± 10.4 | 294.0 ± 197.2 | 6544.7 ± 3793.4 |
| 4-Hydroxy-phenylpyruvic | 11.7 ± 8.5 | 8.9 ± 4.9 | 21.7 ± 10.9 |
| 4-Hydroxyphenyllactic | 5.8 ± 1.2 | 10.8 ± 2.4* | 10.7 ± 0.7 |

Legend : Values shown are mean ± SEM; * p≤0.05 ; ** p≤0.01 compared to control ; § p≤0.05; §§ p≤0.01 compared to HLLKO stable

Table SII. Plasma acylcarnitine levels in HLLKO mice and controls.

| Category | CONTROL STABLE | CONTROL KIC | HLLKO STABLE | HLLKO KIC | HLLKO CRISIS |
|------------------|----------------|------------------|------------------|-------------------|---------------------|
| n | 14 | 3 | 12 | 3 | 5 |
| Free Carnitine | 23.797 ± 1.852 | 9.973 ± 8.489 | 19.770 ± 2.176 | 15.003 ± 3.013 | 19.218 ± 3.814 |
| C-2 (Acetyl) | 12.930 ± 1.064 | 20.017 ± 1.277** | 11.263 ± 1.172†† | 14.570 ± 4.760 | 19.256 ± 4.074 |
| C-3 (Propionyl) | 0.210 ± 0.022 | 0.243 ± 0.058 | 0.258 ± 0.034 | 0.127 ± 0.048 | 0.130 ± 0.024*§§ |
| C-4 | 0.433 ± 0.040 | 0.383 ± 0.019 | 0.472 ± 0.116 | 0.247 ± 0.094 | 0.168 ± 0.066*§† |
| C-5-Hydroxy | 0.021 ± 0.002 | 0.093 ± 0.007** | 0.026 ± 0.003†† | 0.103 ± 0.015§ | 0.102 ± 0.019*§ |
| C-8 | 0.014 ± 0.002 | 0.020 ± 0.000* | 0.014 ± 0.002†† | 0.017 ± 0.007 | 0.026 ± 0.007 |
| C-10:2 | 0.023 ± 0.003 | 0.030 ± 0.006 | 0.015 ± 0.005 | 0.037 ± 0.022 | 0.050 ± 0.025 |
| C-10:1 | 0.018 ± 0.002 | 0.033 ± 0.009 | 0.014 ± 0.003 | 0.023 ± 0.013 | 0.034 ± 0.014 |
| C-10 | 0.020 ± 0.002 | 0.017 ± 0.007 | 0.015 ± 0.002* | 0.023 ± 0.003 | 0.086 ± 0.017*§† |
| C-4-Dicarboxylic | 0.019 ± 0.003 | 0.053 ± 0.020 | 0.025 ± 0.004 | 0.043 ± 0.019 | 0.032 ± 0.015 |
| C-5-Dicarboxylic | 0.010 ± 0.001 | 0.017 ± 0.003 | 0.018 ± 0.003* | 0.033 ± 0.019 | 0.074 ± 0.019§† |
| C-12:1 | 0.009 ± 0.002 | 0.023 ± 0.009 | 0.005 ± 0.002 | 0.037 ± 0.007§ | 0.066 ± 0.029 |
| C-12 | 0.021 ± 0.003 | 0.037 ± 0.009 | 0.017 ± 0.002 | 0.057 ± 0.007§ | 0.292 ± 0.083*§† |
| C-6-Dicarboxylic | 0.011 ± 0.001 | 0.013 ± 0.003 | 0.015 ± 0.002 | 0.030 ± 0.010 | 0.036 ± 0.022 |
| C-14:2 | 0.024 ± 0.003 | 0.337 ± 0.253 | 0.016 ± 0.002* | 0.157 ± 0.132 | 0.132 ± 0.049 |
| C-14:1 | 0.062 ± 0.015 | 0.073 ± 0.015 | 0.041 ± 0.008 | 0.180 ± 0.045 | 0.314 ± 0.065*§† |
| C-14 | 0.064 ± 0.010 | 0.063 ± 0.019 | 0.046 ± 0.007 | 0.247 ± 0.015§§†† | 0.916 ± 0.190*§† |
| C-14-Hydroxy | 0.004 ± 0.001 | 0.003 ± 0.003 | 0.001 ± 0.001 | 0.010 ± 0.000§§§ | 0.048 ± 0.014*§† |
| C-16:1 | 0.061 ± 0.013 | 0.063 ± 0.007 | 0.047 ± 0.011 | 0.660 ± 0.152 | 1.050 ± 0.229*§† |
| C-16 | 0.121 ± 0.018 | 0.127 ± 0.052 | 0.110 ± 0.017 | 0.870 ± 0.294 | 3.276 ± 0.528**§§†† |
| C-16:1-Hydroxy | 0.009 ± 0.001 | 0.010 ± 0.000 | 0.007 ± 0.001 | 0.030 ± 0.000§§§ | 0.104 ± 0.025*§† |
| C-16-Hydroxy | 0.010 ± 0.000 | 0.020 ± 0.006 | 0.010 ± 0.000 | 0.020 ± 0.006 | 0.114 ± 0.033*§† |
| C-18:2 | 0.033 ± 0.005 | 0.053 ± 0.023 | 0.024 ± 0.004 | 0.153 ± 0.038 | 0.994 ± 0.358 |
| C-18:1 | 0.231 ± 0.048 | 0.137 ± 0.019* | 0.157 ± 0.030 | 1.227 ± 0.231§† | 2.752 ± 0.646*§† |
| C-18 | 0.044 ± 0.007 | 0.037 ± 0.017 | 0.052 ± 0.005 | 0.133 ± 0.043 | 0.242 ± 0.047*§ |
| C-18:2-Hydroxy | 0.013 ± 0.003 | 0.010 ± 0.000 | 0.008 ± 0.001 | 0.017 ± 0.003 | 0.082 ± 0.018*§† |
| C-18:1-Hydroxy | 0.015 ± 0.003 | 0.010 ± 0.000* | 0.010 ± 0.002 | 0.040 ± 0.006§† | 0.100 ± 0.029§† |
| C-18-Hydroxy | 0.014 ± 0.001 | 0.010 ± 0.000** | 0.011 ± 0.002 | 0.023 ± 0.009 | 0.028 ± 0.007 |

Legend : Values shown are mean ± SEM; * p≤0.05 ; ** p≤0.01 compared to control stable ; § p≤0.05; §§ p≤0.01; §§§ p≤0.001 compared to HLLKO stable ; † p≤0.05 ; †† p≤0.01 compared to control KIC.

Figure S1

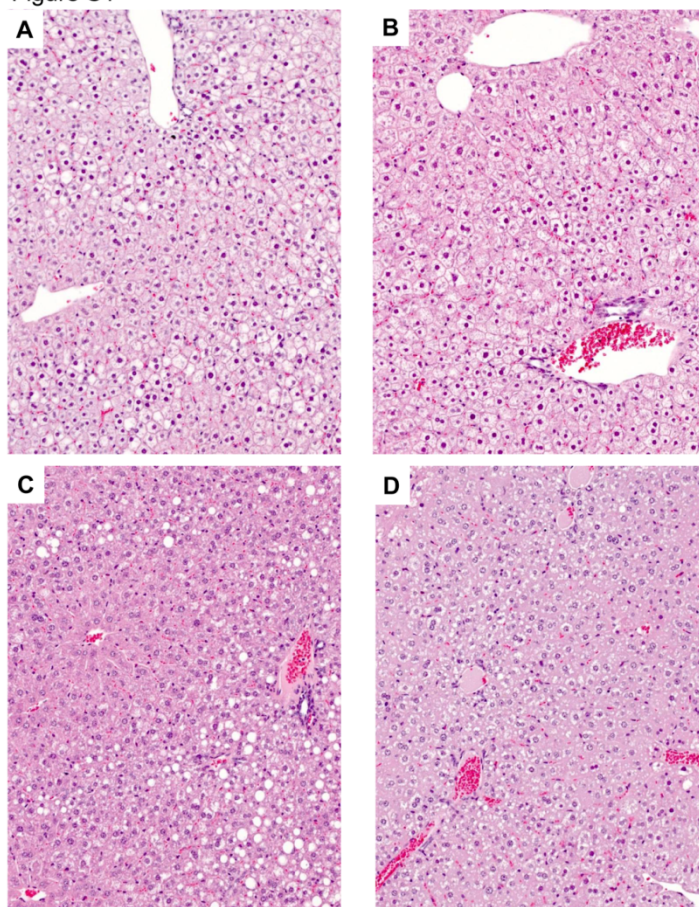
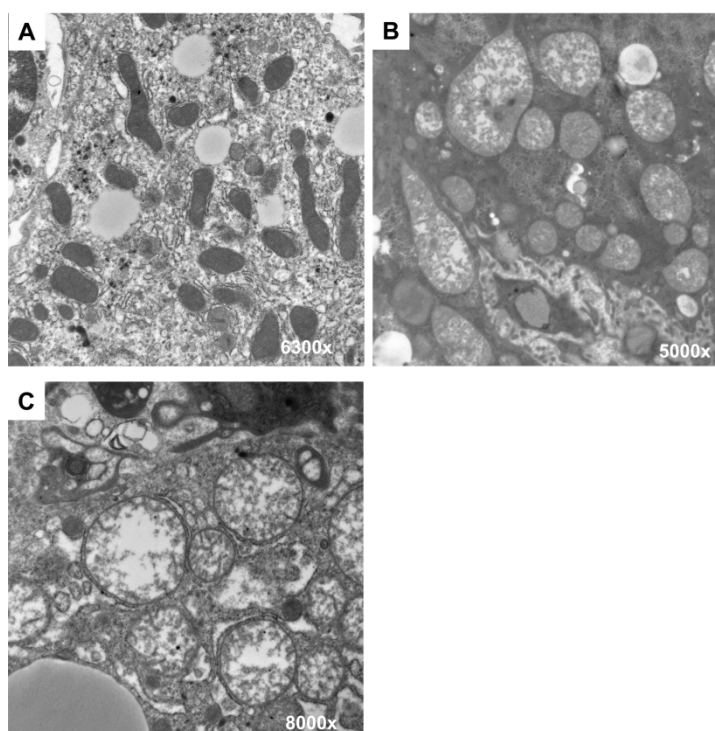


Figure S2



**Chapitre 4 : The effect of fasting and medium chain triglyceride loading
on acyl-CoA levels in liver of normal and short-chain acyl-
CoA dehydrogenase-deficient mice**

Molecular Genetics and Metabolism, short communications (manuscript en attente de publication).

The Effects of Fasting and Medium Chain Triglyceride Loading on Acyl-CoA Levels in Liver of Normal and Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase-Deficient Mice

Gauthier, N.^{a,b}, Wu, JW.^a, Wang, SP.^a, Lépine, F.^c, Mitchell, GA^{a,b*}.

^aCentre de Recherche and Département de Pédiatrie, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, Montréal, Canada

^bDépartement de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada

^cINRS-Institut Armand Frappier, Laval, Canada

*To whom correspondance should be addressed : Grant A Mitchell, M.D., Division of Medical Genetics, Hopital Ste-Justine, 3175 Cote Ste-Catherine, Montreal, Qc Canada H3T 1C5,

Abbreviations: AcAC-CoA, acetoacetyl-CoA; CoA, Coenzyme A; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; MCT, medium chain triglyceride; SCAD, short-chain-acyl-CoA-dehydrogenase; SCADD, SCAD-deficient

ABSTRACT

Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD, EC 1.3.99.2) deficiency (SCADD, MIM 201470) is an autosomal recessive inborn error of mitochondrial fatty acid oxidation that is typically asymptomatic in humans and mice. We assayed short-chain acyl-CoAs in the liver of SCADD mice under basal fed conditions, after an 18h fast and after an enteral medium-chain triglyceride (MCT) load. SCADD mice remained behaviorally normal during fasting and following MCT loading and maintained normal fasting glycemia. Hepatic butyryl-CoA levels were elevated in SCADD mice under fed conditions (SCADD 6.1 ± 0.5 nmole/g wet weight; normal; 2.5 ± 0.4 nmole/g wet weight). With fasting, butyryl-CoA level decreased in controls but increased 1.7-fold in SCADD livers; after MCT loading it increased 1.5-fold controls and 7-fold in SCADD mice.

Keywords: Short chain acyl-CoA dehydrogenase; Coenzyme A; Beta oxidation; Metabolism, inborn error; Mouse, genetically-altered

1.Introduction

Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD, EC 1.3.99.2) catalyses the first step of mitochondrial beta oxidation of butyryl-CoA [1]. SCAD deficiency (SCADD, OMIM 201470) is an autosomal recessive inborn error of metabolism. SCAD gene variants with mildly reduced enzyme activity are present in homozygous form in approximately 6% of the general population [2]. The two main variants are p.R171W (c.511C > T, 69% residual activity) and p.G209S (c.625G > A, 86% residual activity) [2, 3]. Small numbers of SCADD individuals with developmental delay, hypotonia, epilepsy, behavioural disorders and hypoglycemia have been reported, but a causal link between these clinical signs and SCADD is not proven. Most SCADD individuals are clinically normal [1, 2].

Balb/cByJ mice have complete SCAD deficiency because of a 278-bp deletion in the 3' end of the structural gene for SCAD [4]. Like SCAD-deficient humans, these mice have an increase of butyrate-related derivatives in blood (C4-carnitine) and urine (methylsuccinic and ethylmalonic acids, butyrylglycine) [5]. SCADD mice are usually asymptomatic, although fasting hypoglycemia has been described [5]. A possible explanation for the mildness of the SCADD phenotype in humans and mice is that medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) can also catalyze the oxidation of butyryl-CoA [5], partially compensating the SCAD deficiency. Also, glycine conjugation of butyryl-CoA provides an additional mechanism of elimination [6].

In hereditary deficiencies of acyl-CoA metabolism like SCADD, changes in acyl-CoA concentrations are proposed to be central events in pathophysiology [7]. There have been several important studies in normal rodents [8, 9], and studies with affected human fibroblasts, mitochondria and even liver in a small number of humans [10]. Few studies have assayed acyl-CoAs in key organs of rodents with a hereditary deficiency of acyl-CoA metabolism under controlled conditions [11]. Here we report the acyl-CoA profile of SCADD mouse liver in normal fed conditions and under the stresses of fasting and of medium chain triglyceride loading.

2. Materials and methods

2.1 Material

Chemicals were from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) except if noted otherwise. The 3 cc Oasis HLB solid-phase extraction column used in acyl-CoA isolation procedure was from Waters (Milford, MA, USA). MCT oil was from Nestlé Nutrition (Florham Park, NJ).

2.2 Mice

Six-week-old male Balb/cByJ (SCADD) mice and control Balb/c mice were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbour, Maine) and were studied at 8 weeks of age. Mice were housed with a 12-h light-dark cycle, with the light phase from 6:00 AM to 6:00 PM. They received JL Rat and

Mouse/Auto 6F Diet (Lab Diet, Aberfold, Ontario, Canada). The mice were studied under three conditions: fed, fasted and following a load of medium chain triglycerides (MCTs). In the fed state, mice were sacrificed at 10 AM after having had full access to food and water until that time. 18-hour fasting: chow was removed at 5 PM but mice had free access to water. The next day, they were sacrificed at 11 AM. MCT loading: food was removed at 8 AM. At noon, the mice were gavaged as described [11], with 200 μ L (7.5 mg/g body weight) of medium chain triglyceride (MCT) oil. The fatty acid composition is: <6% shorter than C8, 67% C8, 23% C10, <4% longer than C10. Mice were sacrificed at 2 PM. All experiments were approved by the animal care committee of CHU Sainte-Justine.

2.3 Short-chain acyl-CoA assay.

This was performed as described [11] using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The following acyl-CoA species are routinely quantified: AcAc, acetyl, propionyl, butyryl, succinyl, isovaleryl, 3-methylcrotonyl, 3-hydroxyisovaleryl and HMG-CoAs).

2.4 Blood glucose measurement

Blood was obtained from the tail vein for assay with a glucometer (ACCU-Chek Compact Plus, Roche, Laval, Quebec, Canada).

3. Results and discussion

Under all conditions studied, liver butyryl-CoA levels in SCADD mice were higher than in controls (Figure 1). An 18-hour fast caused a 1.7-fold increase in butyryl-CoA in SCADD mice ($p=0.002$), whereas a decrease was observed in controls. 2h after the MCT gavage, SCADD mice showed a 7-fold increase ($p=0.018$), and controls, a 2-fold increase ($p=0.46$). Levels of other short chain acyl-CoAs were similar in SCADD and control mice under all conditions studied. Baseline acyl-CoA levels in control Balb/c mice were similar to those observed previously in C57Bl/6 mice [11].

With fasting, there were decreases in acyl-CoAs related to the Krebs cycle (acetyl-, succinyl-CoA) and to the HMG-CoA pathway of ketogenesis (acetoacetyl-, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA). These differences were similar in control and SCADD mice.

Fasting and MCT gavage were well tolerated, with no evidence of lethargy in either SCADD or control mice. Fasting glycemia was 3.7 ± 0.2 mM in controls ($n=5$) and 4.8 ± 0.4 mM in SCADD mice ($n=10$; $p=0.055$). There was therefore no evidence of the previously-reported fasting hypoglycemia [5]. During preparation of this article, Palladino et al reported the profile of liver acyl-CoAs in 24-hour fasted Balb/cByJ mice and controls [12]. Their values agree well with our findings in 18-hour fasted mice.

SCADD mice can be contrasted with another model of an inborn error of acyl-CoA metabolism, HLLKO mice [11], which have a liver-specific deficiency of HMG-CoA lyase (HL). HLLKO mice show chronic elevation of HMG-CoA and other CoA esters related to leucine degradation. They experience fatal crises of hypoglycemic coma. Fasting SCADD mice and controls show similar low levels of hepatic acetyl-CoA as do HLLKO mice in crisis, but SCADD mice have a lesser accumulation and a different profile of acyl-CoA species compared to HLLKO liver during crises. The acyl-CoA pattern in SCADD liver exerts lesser effects on liver function than that of HLLKO liver.

It has been suggested that acyl-CoA-related effects may arise from toxic accumulation of acyl-CoA that are normally present transiently and at low levels during their degradation, or from insufficient levels of CoAs like acetyl-CoA, which normally mediate many essential reactions. Data to date are consistent with a combined mechanism by which clinical signs become manifest not only when the levels of acetyl-CoA diminish, but also when other acyl-CoA(s), normally present at low levels, accumulate. A strong general conclusion can not yet be drawn regarding the mechanism of acyl-CoA-mediated toxicity. It is notable, however that SCADD mice remain asymptomatic despite having marked increases in butyryl-CoA, and that this correlates well with the good health enjoyed by most SCADD humans and mice.

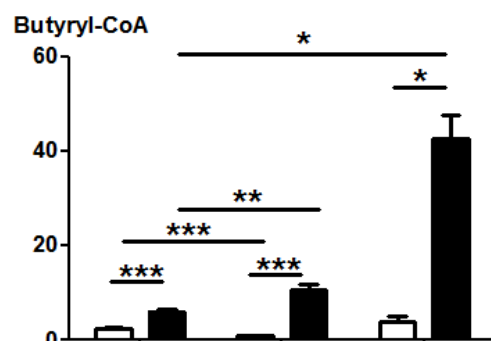
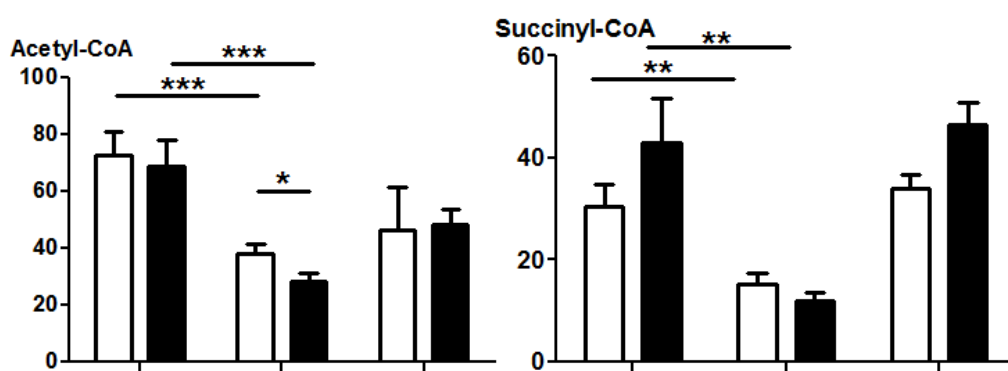
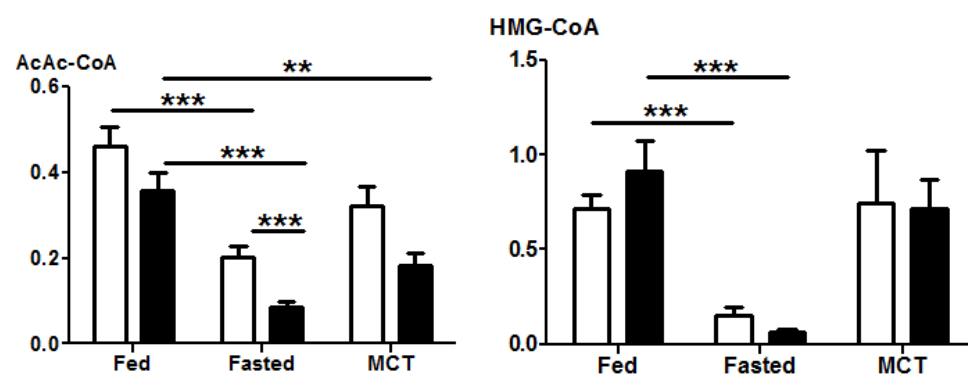
FIGURE LEGEND

Figure 1: Liver short-chain acyl-CoA patterns in normal and SCADD liver. Mice were studied in the fed state (n=9), at 18h fasting (n=9) and after MCT-gavage (n=3). (a) a beta-oxidation-related acyl-CoA, butyryl-CoA; (b) Krebs cycle-related acyl-CoAs, acetyl and succinyl-CoA and (c) ketogenesis-related acyl-CoAs, AcAc- and HMG-CoAs. Acyl-CoA levels are shown as nmol/g liver (wet weight). Error bars represent SEM. Unfilled bars, controls; filled, SCADD. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ AcAc-CoA, acetoacetyl-CoA; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA

References

- [1] B.T. van Maldegem, M. Duran, R.J. Wanders, K.E. Niezen-Koning, M. Hogeveen, L. Ijlst, H.R. Waterham, F.A. Wijburg, Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity in short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency JAMA : the journal of the American Medical Association 296 (2006) 943-952.
- [2] B.T. van Maldegem, R.J. Wanders, F.A. Wijburg, Clinical aspects of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency Journal of inherited metabolic disease 33 (2010) 507-511.
- [3] M.J. Corydon, J. Vockley, P. Rinaldo, W.J. Rhead, M. Kjeldsen, V. Winter, C. Riggs, D. Babovic-Vuksanovic, J. Smeitink, J. De Jong, H. Levy, A.C. Sewell, C. Roe, D. Matern, M. Dasouki, N. Gregersen, Role of common gene variations in the molecular pathogenesis of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency Pediatric research 49 (2001) 18-23.
- [4] M.E. Hinsdale, C.L. Kelly, P.A. Wood, Null allele at Bcd-1 locus in BALB/cByJ mice is due to a deletion in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase gene and results in missplicing of mRNA Genomics 16 (1993) 605-611.
- [5] P.A. Wood, B.A. Amendt, W.J. Rhead, D.S. Millington, F. Inoue, D. Armstrong, Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in mice Pediatric research 25 (1989) 38-43.
- [6] I.A. Qureshi, L. Ratnakumari, A. Michalak, R. Giguere, D. Cyr, R.F. Butterworth, A profile of cerebral and hepatic carnitine, ammonia, and energy metabolism in a model of organic aciduria: BALB/cByJ mouse with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency Biochemical medicine and metabolic biology 50 (1993) 145-158.
- [7] G.A. Mitchell, N. Gauthier, A. Lesimple, S.P. Wang, O. Mamer, I. Qureshi, Hereditary and acquired diseases of acyl-coenzyme A metabolism Molecular genetics and metabolism 94 (2008) 4-15.

- [8] B.E. Corkey, A. Martin-Requero, E. Walajtys-Rode, R.J. Williams, J.R. Williamson, Regulation of the branched chain alpha-ketoacid pathway in liver *The Journal of biological chemistry* 257 (1982) 9668-9676.
- [9] J.R. Williamson, B.E. Corkey, Assay of citric acid cycle intermediates and related compounds--update with tissue metabolite levels and intracellular distribution *Methods in enzymology* 55 (1979) 200-222.
- [10] B.E. Corkey, D.E. Hale, M.C. Glennon, R.I. Kelley, P.M. Coates, L. Kilpatrick, C.A. Stanley, Relationship between unusual hepatic acyl coenzyme A profiles and the pathogenesis of Reye syndrome *The Journal of clinical investigation* 82 (1988) 782-788.
- [11] N.W. Gauthier, J.W.; Wang, S.P.; Allard, P.; Mamer, O.A.; Sweetman, L.; Moser, A.B.; Kratz, L.; Alvarez, F.; Robitaille, Y.; Lépine, F.; Mitchell, G.A., A liver-specific defect of acyl-CoA degradation produces hyperammonemia, hypoglycemia and a distinct hepatic acyl-CoA pattern *PLoS one* (2013) In Press.
- [12] A.A. Palladino, J. Chen, S. Kallish, C.A. Stanley, M.J. Bennett, Measurement of tissue acyl-CoAs using flow-injection tandem mass spectrometry: acyl-CoA profiles in short-chain fatty acid oxidation defects *Molecular genetics and metabolism* 107 (2012) 679-683.

Figure 1**a****b****c**

Annexe

Durant mes études doctorales, j'ai également participé au projet d'une étudiante à la maîtrise du laboratoire. Son projet porte sur l'étude de la déficience en HL dans le cœur. Elle a croisé la souris avec l'allèle d'HL flanqué de séquence Lox que j'ai utilisé dans mon projet avec une souris exprimant le Cre à partir d'un promoteur cardio-spécifique et inductible au tamoxifen. Ces souris HLHKO (HL Hear Knock-Out) développent un phénotype cardiaque (cardiomyopathie dilatée) suite à une injection *i.p.* de KIC. J'ai effectué l'analyse du profil des acyls-CoA dans le cœur de ces souris et nous avons pu observer le même type de phénomène CASTOR suite à un challenge avec le KIC. Les résultats présentent une accumulation des composés de la leucine suite à l'injection de KIC et ce, autant chez la souris HLHKO que la souris contrôle. L'accumulation d'isovaléryl-CoA et de 3-OH-isovaléryl-CoA semble plus importante chez la souris HLHKO. Il est intéressant de noter également une diminution de l'acétyl-CoA et du succinyl-CoA chez les souris HLHKO versus ses contrôles. Il s'agit d'expériences préliminaires effectuées avec un nombre limité de souris. Il est toutefois intéressant d'observer le même type de répartition des acyls-CoA que dans le modèle HLLKO. Ces résultats sont conséquents avec un corollaire de l'hypothèse CASTOR, soit l'autonomie cellulaire, selon lequel les signes spécifiques aux tissus sont créés par un phénomène CASTOR localisé, séquestré dans les cellules du tissu en question.

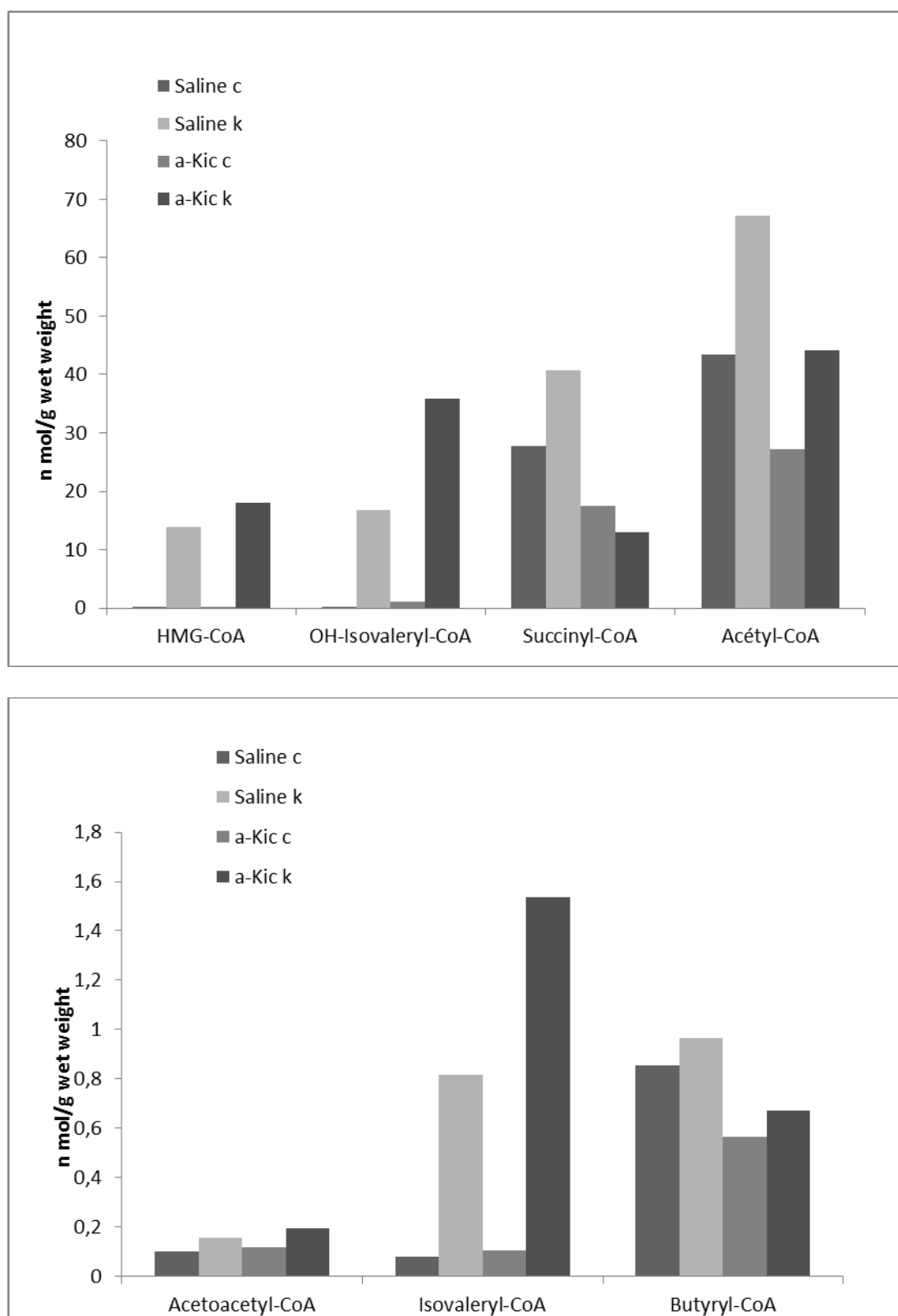


Figure 9 : Dosage des acyls-CoA à chaînes courtes dans le cœur de souris HLHKO et contrôles traitées ou non avec KIC. HLHKO n=2, ctrl n=3

Chapitre 5 : DISCUSSION

Les études présentées dans cette thèse avancent les connaissances sur les maladies métaboliques héréditaires de la dégradation des acyls-CoA (EIMAC) sur plusieurs plans. Discutons d'abord des modèles de souris étudiés et par la suite des observations en relation avec les hypothèses émises initialement sur le phénomène CASTOR.

Mentionnons tout d'abord que l'étude de modèles animaux est justifiée car l'analyse des organes clés de ces maladies, dans différents états physiologiques, est impossible chez des patients humains. En contrepartie, nos études suggèrent que le dosage des acyls-CoA tissulaires est essentiel pour la compréhension des EIMAC.

5.1 Le modèle HLLKO

La souris HLLKO a permis de documenter l'existence d'un phénomène CASTOR qui induit un bouleversement du métabolisme énergétique. La souris HLLKO est viable à la naissance en opposition au modèle avec une invalidation constitutive du gène d'HL. La survie de la souris HLLKO peut s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord, notons que l'invalidation hépatique conditionnelle du gène d'HL n'est pas effective dès la conception en opposition à la méthode de l'invalidation constitutive. Effectivement, la première étape pour l'invalidation avec la méthode Cre-Lox est l'activation du

promoteur auquel le transgène Cre est couplé. Dans le cas des souris HLLKO, le promoteur de l'albumine est activé à environ 10.5 jours *pc* (Weisend et al., 2009). Ceci implique que la production d'HL n'est pas affectée dans les 10 premiers jours *in utero*. Ensuite le gène d'HL est modifié par le Cre et la protéine HL cesse d'être produite. Étant donné la demi-vie de l'enzyme HL est d'environ 14-19 heures, tel que calculé dans des mitochondries de fibroblastes humains (Ashmarina et al., 1999), l'activité d'HL pourrait persister durant plusieurs jours après l'inactivation du gène par la recombinaise Cre. Ainsi, s'il y a une fenêtre cruciale nécessitant la présence d'HL dans les premiers jours du développement *in utero*, la quantité résiduelle d'HL pourrait être suffisante pour la poursuite du développement de l'embryon.

Une autre hypothèse pour expliquer la survie des souris HLLKO est qu'étant donné le caractère hépato-spécifique de l'invalidation d'HL, il est possible que la présence d'HL dans les autres organes, qui ne sont pas touchés par l'invalidation induite par le transgène Cre, permette la survie *in utero* du fœtus KO. Ainsi, le décès *in utero* de la souris invalidée en HL de façon constitutionnelle pourrait s'expliquer par l'absence d'HL dans les tissus extra-hépatiques. Ceci plaide contre l'hypothèse initiale du laboratoire que l'invalidation d'HL dans le foie était la cause du décès prénatal des souris déficientes en HL. L'invalidation dans d'autres tissus est possible avec l'allèle HL-Lox et des transgènes Cre disponibles qui sont exprimés sélectivement dans plusieurs tissus autres que le foie. Ces études apporteront peut-être

d'autres éléments de réponse pour expliquer le décès du modèle HL constitutif.

Sous une diète standard, la totalité des souris HLLKO décède entre 3 et 5 semaines d'une crise très semblable à ce que l'on observe chez les patients humains atteints de déficience en HL. Cette crise est caractérisée par une hypoglycémie sévère, une hyperammoniémie, une léthargie progressive et finalement par un coma et le décès de l'animal. De tels signes sont très fréquents dans les maladies liées au CoA chez l'humain. Il s'agit, à notre connaissance, du premier modèle de ce groupe de maladies qui reproduit aussi fidèlement une crise métabolique typiquement rencontrée chez les patients humains, tout en permettant son étude.

Le changement de diète a été basé sur une réflexion du rôle physiologique d'HL et sur les recommandations diététiques pour les patients présentant une déficience en HL, soit d'offrir une alimentation réduite de l'acide aminé précurseur, la leucine, et de favoriser la prise fréquente d'aliments afin de diminuer au maximum les périodes de jeûne. Étant donné que la souris s'alimente principalement durant la nuit mais qu'elle boit jour et nuit, l'ajout du glucose dans l'eau a permis d'apporter un apport glucidique régulier. Ceci a un effet salutaire dans la déficience en HL via deux mécanismes; la suppression de la cétogenèse (Mitchell, 2001; Mitchell et al.,

2008) ainsi que la suppression de la dégradation protéique (Vazquez et al., 1985).

Ainsi nous avons pu travailler avec des souris adultes (2-3 mois) pour les expériences. Cette diète permet même la survie d'au moins certaines souris HLLKO au-delà d'un an. Le changement de diète a permis d'obtenir des souris de taille suffisante pour l'isolement des hépatocytes. Toutefois, la mortalité suite à des crises spontanées était substantielle malgré l'introduction du régime adapté, environ 40% à 3 mois (voir Chapitre 3, figure 2). Les souris HLLKO restent fragiles. Par exemple, après un bris du système de climatisation, la majorité des souris HLLKO sont décédées. Cette fragilité des souris HLLKO a réduit le nombre de souris disponibles pour cette étude.

L'analyse de plusieurs marqueurs des peroxysomes n'a pas permis de démontrer une différence entre les souris HLLKO et les souris contrôles (résultat non présenté). Mon laboratoire a démontré qu'HL est présent dans les peroxysomes et les mitochondries (Ashmarina et al., 1999). Son rôle dans le peroxysome est encore inconnu à ce jour. L'inactivation d'HL dans les peroxysomes des hépatocytes ne semble pas empêcher leur fonction et donc, son implication dans la crise métabolique est fort probablement négligeable. Toutefois, le HL dans les peroxysomes pourrait avoir un rôle important dans d'autres organes comme le cerveau, un organe qui est affecté dans des

maladies peroxisomales. Ceci sera à tenir en compte dans tout autre modèle d'invalidation organo-sélective d'HL qui pourrait être créé.

Selon une mesure du flux du cycle de Krebs, soit la quantification du dégagement du $^{14}\text{CO}_2$ à partir du $[2\text{-}^{14}\text{C}]$ pyruvate, on trouve une diminution d'environ 50% de la production de $^{14}\text{CO}_2$, dans les mitochondries hépatiques de souris HLLKO pré-incubées avec le KIC versus celles sans KIC. D'autres indicateurs de la fonction du cycle de Krebs tel que les études d'isotopes stables dans les organes perfusés et les études de spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN) pourraient confirmer et raffiner cette observation. Des études pilotes par RMN, discuté plus tard, appuient fortement la notion d'une dysfonction du cycle de Krebs dans le foie des souris HLLKO. Une diminution, même mineure, du flux du cycle de Krebs peut avoir un impact majeur sur le métabolisme énergétique de la cellule étant donné son rôle central pour produire NADH et FADH_2 , des précurseurs pour la chaîne respiratoire mitochondriale.

5.2 Les souris SCADD

Les souris SCADD ont été choisies comme modèle car elles sont généralement asymptomatiques sur le plan clinique, comme le sont les humains déficients en SCAD. Nous avons voulu explorer si les changements

CASTOR existent dans ce modèle et si oui, quelles étaient leurs sévérités. Nous avons trouvé une augmentation spécifique du butyryl-CoA, sans changements significatifs de la concentration d'autres acyls-CoA par rapport aux témoins.

Nous avons trouvé qu'il est possible d'augmenter le taux de butyryl-CoA par un jeûne et par une charge alimentaire en MCT, un précurseur de l'enzyme SCAD. Cette observation est importante étant donné le taux élevé de gens déficients en SCAD. Ceux-ci pourraient possiblement, dans des conditions extrêmes, développer des complications médicales. Par exemple, on pourrait penser à une diète cétogène ou la prise de médicaments connus pour induire une crise métabolique typique des maladies EIMAC tel que le valproate et l'aspirin. Rappelons aussi l'hypothèse de l'hétérozygotie combinée dans les EIMAC (Schuler et al., 2005). Un patient SCADD qui en plus est déficient sous une forme homo- ou hétérozygote d'une autre enzyme de la dégradation des acyls-CoA, pourrait dans des conditions de stress nutritionnel ou physiologique, développer une crise métabolique. Dans la SCADD, l'activité MCAD pourrait exercer un effet protecteur majeur à cause de sa capacité à dégrader le butyryl-CoA. Il serait particulièrement intéressant d'obtenir des souris déficientes à la fois en SCAD et MCAD et d'observer leur réponse à une charge en butyrate.

5.3 Retour sur les hypothèses initiales

Mes travaux ont permis de tester plusieurs des hypothèses que j'ai énumérés à la fin de l'introduction. La suite de la discussion sera orientée en fonction de ces hypothèses.

1- Dans les maladies héréditaires de la dégradation des acyls-CoA, il y a un profil anormal et distinct des acyls-CoA (l'hypothèse d'un phénomène CASTOR).

Un profil anormal et distinct des acyls-CoA a été détecté dans chacun des modèles étudiés (HLLKO, SCADD et HLHKO). Les différents profils se distinguent principalement au niveau des acyls-CoA qui sont accumulés en amont de la déficience enzymatique.

Durant la préparation de cette thèse, une équipe a publié une méthode de détection simultanée des acyls-CoA hépatiques à chaînes courtes, moyennes et longues. L'absence de séparation chromatographique empêche la distinction d'acyls-CoA avec des masses identiques ou similaires. Malgré tout, il est intéressant de noter qu'ils ont observé un profil perturbé des acyls-CoA après un jeûne de 24h dans deux modèles animaux CASTOR, soit les souris déficiente en SCAD et SCHAD. Il s'agit d'une augmentation du C4-CoA chez la souris SCAD alors qu'il y a une diminution du C2-CoA et une

augmentation des C6-, 3OH-C6-, C8:1-, C8-DC-CoA chez la souris SCHAD (Palladino et al., 2012).

2- La relation entre le profil d'accumulation des acides organiques urinaires et des acyls-carnitines plasmatiques et l'accumulation des acyls-CoA intracellulaires est différent pour chaque acyl-CoA.

Dans le foie des souris HLLKO, parmi les quatre dernières étapes de la dégradation de la leucine, nous retrouvons des exemples d'une grande diversité de rapports entre le niveau d'un acyl-CoA et les niveaux de ses métabolites urinaires et plasmatiques mesurés en clinique. Dans le cas du 3-OH-IVA-CoA, il y a corrélation entre la concentration hépatique de l'acyl-CoA versus l'excrétion de son acide libre. Pour l'HMG-CoA, le niveau de l'acyl-CoA est stable même en période de crise contrairement à l'excrétion de l'acide organique qui augmente lors de l'état aigu. Finalement, pour le 3MGO-CoA, il y a une grande concentration d'acides organiques dans l'urine en dépit d'un niveau très faible de l'acyl-CoA. La mesure des acyls-CoA est un élément essentiel du métabolome et de la compréhension de la physiopathologie des maladies EIMAC.

Ce déséquilibre entre le patron détecté par les dosages cliniques dans l'urine et dans le sang versus la concentration hépatique des acyls-CoA est d'importance clinique. On peut, par exemple, avoir deux discours selon le niveau urinaire d'un métabolite clé. Habituellement, en clinique, un niveau très élevé est considéré comme néfaste car il est le témoin d'un état métabolique précaire ou d'un stress. Toutefois, on pourrait dire également que l'excrétion d'un métabolite en forte concentration pourrait être salutaire : il en résulte une détoxification avec une libération rapide du CoA ainsi qu'une diminution du pool d'acyls CoA. Le même type de déséquilibre a été souligné dans les travaux publiés sur les souris SCAD et SCHAD (Palladino et al., 2012).

3- Un élément commun aux EIMAC est la diminution de la disponibilité de l'acétyl-CoA et du CoA libre; en combinaison avec l'accumulation d'acyls-CoA, ceci est toxique.

Selon mes résultats, la diminution de la concentration de l'acétyl-CoA ou l'augmentation de la concentration des acyl-CoA sont insuffisantes en soi pour expliquer la crise métabolique.

La concentration de l'acétyl-CoA diminue dans les phénomènes CASTOR étudiés. Une diminution de la concentration de l'acétyl-CoA est liée

à la crise métabolique dans la souris HLLKO. Toutefois, une diminution d'un degré similaire est retrouvé après un jeûne de 18h chez la souris SCADD et contrôles.

La diminution de la concentration d'acétyl-CoA pourrait donc être nécessaire mais elle est en soi insuffisante pour induire la crise métabolique. Ceci s'applique également à l'accumulation des acyls-CoA. Les concentrations des acyls-CoA de la voie de dégradation de la leucine sont augmentées chez la souris HLLKO en état chronique et davantage en état aigu. Or, une augmentation de la concentration de butyryl-CoA est observée lors de la charge en huile MCT chez le modèle SCADD sans l'apparition de signes.

Les évidences découlant de mes travaux sont en accord avec l'idée d'une synergie entre la diminution de la concentration de l'acétyl-CoA et de l'augmentation de la concentration d'un ou des acyls-CoA inhibiteur. La toxicité précise de chaque acyl-CoA n'a pas été testée individuellement mais on peut s'attendre à ce que les concentrations importantes des acyls-CoA accumulés tel que l'HMG-CoA et le 3OH-IVA-CoA en fait de candidats ayant des potentiels inhibiteurs importants. Cette hypothèse peut maintenant être testée sur d'autres modèles.

Il a été démontré dans la littérature que plusieurs acyls-CoA à chaînes courtes peuvent inhiber des réactions enzymatiques clés (Corkey and Deeney, 1990). Les valeurs intra-mitochondriales calculés des différents acyls-CoA, se trouvent dans des concentrations près des K_i et K_m d'enzymes clés tel que le NAGS et PC.

Il est important de mettre en contexte tous ces valeurs de K_a et de K_i dans la réalité d'une cellule vivante. Plusieurs de ces chiffres ont été obtenus en effectuant des études enzymatiques *in vitro* en modifiant un paramètre à la fois afin d'isoler son effet sur la réactivité de l'enzyme étudiée. Il faut pouvoir faire un pas en arrière et remettre tous ces résultats dans le contexte d'une cellule entière et vivante. Une enzyme peut être inhibée ou activée par plusieurs molécules. Par exemple, l'effet inhibiteur du HMG-CoA sur l'enzyme PC est clairement documenté (Fung, 1971b; Keech, 1985). L'inhibition par l'HMG-CoA est augmentée si la concentration d'acétyl-CoA est abaissée. Dans la mitochondrie d'une cellule vivante d'une personne atteinte d'une EIMAC, on peut retrouver une augmentation anormale de plusieurs acyls-CoA ainsi qu'une diminution d'acétyl-CoA et d'autres acyl-CoA comme le succinyl-CoA. Cette cellule de patient peut également avoir une concentration anormale d'autres métabolites, de pH et de changement physique de certaines mitochondries. C'est une situation très complexe où chaque acyl-CoA aura un effet différent sur une enzyme et où un acyl-CoA aura un effet différent sur différentes enzymes. L'activité de plusieurs enzymes peut être influencée par la présence d'acyl-CoA, soit via une activation ou une inhibition.

L'effet activateur ou inhibiteur des différents acyls-CoA et l'intensité de cet effet sera différent d'une enzyme à l'autre. Dans ces circonstances, l'effet inhibiteur de l'ensemble des différents acyls-CoA est difficile à prédire et pourrait être substantiellement plus importante que l'inhibition mesurée in vitro.

4- Le phénomène CASTOR primaire mène à une inhibition des grandes voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, l'uréogénèse et une perturbation de l'état oxydo-réducteur mitochondrial, ce qui déclenche les signes typiques de ce groupe de maladies. Le phénomène CASTOR va induire l'activation de voies de détoxification non-physiologiques ou l'insuffisance de produits en aval de la voie métabolique affectée.

Deux observations chez les souris HLLKO appuient fortement cette hypothèse. En premier lieu, la présence de l'hypoglycémie observée chez le modèle HLLKO avec la combinaison d'une absence de réponse hyperglycémique suite à une charge en pyruvate et des concentrations d'acétyl-CoA et d'HMG-CoA atteignent des niveaux qui, ensemble, peuvent inhiber l'enzyme PC. Des études préliminaires par RMN du flux du métabolisme énergétique suite à une injection de glucose marqué au ^{13}C ont révélées une inhibition du flux catalysé par l'enzyme PC par l'observation d'un niveau anormalement bas d'aspartate (C. Zwingmann, communication

personnelle). L'absence d'hypoglycémie dans le modèle SCADD, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature, pourrait s'expliquer par différents facteurs. Le butyryl-CoA peut avoir un effet inhibiteur moins important que les acyls-CoA qui sont accumulés dans le modèle HLLKO. Il est également important de souligner qu'une accumulation sévère de butyryl-CoA n'a pas été observée de façon simultanée à une diminution de l'acétyl-CoA dans le modèle SCADD. Il serait intéressant, dans le futur, de tester directement l'effet de concentrations calculées de butyryl-CoA et d'acétyl-CoA sur l'activité de l'enzyme NAGS purifiée.

En deuxième lieu, une hyperammoniémie sévère est observée chez la souris HLLKO. FX Coudé a déjà proposé le NAGS comme une cible possible d'inhibition pour expliquer l'hyperammoniémie basée sur ses observations d'une inhibition du NAGS par des acyls-CoA à chaînes courtes (Coude et al., 1979). Ses travaux sur l'inhibition du NAGS et de l'uréogénèse dans des hépatocytes par le valproate vont également dans la même direction avec en plus l'observation d'une diminution de l'acétyl-CoA (Coude et al., 1983).

L'hyperammoniémie est observée chez des patients souffrant d'une EIMAC. Nous faisons la démonstration de l'inhibition du NAGS dans l'animal vivant par la correction de l'hyperammoniémie par le carglumate. C'est la

première démonstration d'une chaîne continue d'événements reliant une déficience enzymatique à un signe clinique d'une EIMAC.

Le carglumate est suffisant pour corriger l'hyperammoniémie dans notre modèle. Il n'est pas exclu que la production de l'urée soit diminuée par d'autres causes que l'inhibition de NAGS, par exemple, une baisse de l'ATP. Il est important de mentionner qu'une souris traitée tardivement avec carglumate n'a pas réagi au traitement et est décédée. Ceci suggère qu'un traitement rapide de l'hyperammoniémie est souhaitable et que d'autres facteurs que l'inhibition de la NAGS pourraient jouer un rôle, au moins dans la situation où l'hyperammoniémie est présente depuis plusieurs heures.

Mes travaux ne m'ont pas permis d'étudier l'état oxydo-réducteur mitochondrial. Il serait toutefois intéressant de regarder cet aspect dans la suite du projet.

5- Le CoA et l'acétyl-CoA servent de signaux métaboliques dans la physiologie cellulaire et ont une influence différente que dans leur rôle métabolique connu.

Mes travaux n'ont pas permis de tester cette hypothèse. La diminution de l'acétyl-CoA pourrait toutefois jouer un rôle. L'acétylation a un rôle sur la modulation du métabolisme énergétique et sur des protéines mitochondriales comme la LCAD (Hirschey et al., 2010) et l'HMG-CoA synthase mitochondriale (Shimazu et al., 2010). Ainsi, la diminution de la concentration de l'acétyl-CoA pourrait avoir une influence différente que via son rôle dans le métabolisme. Cette question fait partie intégrante d'un projet du laboratoire pris en charge par ma collègue au laboratoire.

6- Deux états cliniques distincts sont présents dans les maladies CASTOR : aigu et chronique.

Cette hypothèse, inspirée par des observations cliniques, s'est confirmée dans les modèles HLLKO et HLHKO. Le modèle SCADD, est tolérant aux stress qu'on lui a fait subir et un état aigu n'a pas pu être détecté. Tel que discuté précédemment, notre hypothèse actuelle va dans la direction d'une combinaison d'une diminution d'acétyl-CoA et d'une accumulation d'acyls-CoA inhibiteurs d'au moins une enzyme clé qui supprimera une fonction vitale.

7- L'intensité de la perturbation des niveaux des acyls-CoA (phénomène CASTOR) et la présence d'un seuil critique entraînant la crise explique le développement de signes et complications sévères chez certains patients alors que d'autres présentent un état clinique tout à fait normal.

Une partie de la réponse est dans la variation du phénomène CASTOR et l'hypothèse d'un seuil critique qui, une fois franchi déclenche la crise métabolique. Tel que démontré par nos études, l'intensité du phénomène CASTOR varie en fonction de l'état de la souris. Nous proposons que le métabolisme cellulaire peut tolérer un niveau d'intensité du phénomène CASTOR mais qu'il existe un seuil critique au delà duquel il devient intolérable pour la cellule et que le mécanisme de compensation devient insuffisant. Il devient alors impossible de fonctionner adéquatement pour soutenir la vie de la cellule, de l'organe ou de l'animal entier. La souris HLLKO est un exemple typique de cette situation où tant que le phénomène CASTOR est contrôlé par les mécanismes de compensation et une diète adéquate, le seuil n'est pas franchi et la souris ne présente pas de phénotype de crise. Dès que le seuil est franchi, par une injection de KIC, un jeûne, etc..., la souris entre dans une crise métabolique. Le modèle SCADD présente la forme asymptomatique avec une variation du phénomène CASTOR mais il semble que le seuil nécessaire à la décompensation n'est jamais ou très rarement atteint. Il est possible que dans les cas de décompensation répertoriés dans la littérature, le seuil fut franchi chez ces patients SCADD.

Ce ne sont pas toutes les maladies EIMAC qui vont passer d'un état métabolique à l'autre de la même façon. Par exemple, les patients MCAD sont asymptomatiques mais vont développer une crise métabolique sévère et soudaine qui, lorsque traité, va permettre au patient de récupérer et retrouver un état normal. Le patient SCAD, va quant à lui, conserver un état normal. Par contre, tel que démontré dans mes travaux, l'état CASTOR va varier mais sans passer le seuil qui permettrait d'observer certaines signes cliniques. Finalement, le dernier exemple est la déficience en HL, où le patient va majoritairement être dans l'état chronique mais où celui-ci est plus à risque de franchir le seuil et développer une crise métabolique typique de l'état aigu.

8- Dans les conditions CASTOR, l'accumulation des acyls-CoA et ses conséquences peuvent survenir quel que soit l'état des cellules environnantes (hypothèse de l'autonomie cellulaire tel que présenté au chapitre 2).

Nous ne pouvons pas démontrer cette hypothèse explicitement à partir de mes travaux mais elle est cohérente avec plusieurs observations. Tout d'abord, les manifestations d'une déficience en HL sont différentes entre les modèles HLLKO et HLHKO et sont spécifiques à l'organe ciblé. L'HLLKO ne développe des signes que dans le foie et l'HLHKO uniquement dans le cœur.

Deuxièmement, la présence d'une acidurie organique typique de la déficience en HL chez la souris HLLKO, malgré la présence d'une activité enzymatique normale dans les autres organes, appuie cette hypothèse. Ceci démontre qu'il n'y a pas de forte collaboration entre les différents tissus pour cette dégradation et qu'une fraction substantielle des acides libérés par des acyls-CoA sont excrétés plutôt que d'être captés et utilisés par les autres organes.

Dans les souris invalidées spécifiquement dans les organes à grande diversité cellulaire tel que le cerveau, ces considérations pourraient être très importantes pour distinguer le type cellulaire responsable des manifestations neurologiques.

9- Le foie est touché dans une haute proportion des maladies CASTOR étant donné son importance centrale dans le métabolisme énergétique et la dégradation des acides aminés.

Nos résultats obtenus avec le modèle HLLKO démontrent un rôle central du foie dans le développement des signes typiques des maladies CASTOR. Une invalidation d'HL uniquement dans les hépatocytes est suffisante pour développer les signes classiques des maladies EIMAC.

10- Les manifestations extra-hépatiques sont spécifiques à chaque pathologie.

Bien que mes travaux ne puissent confirmer cette hypothèse, plusieurs résultats nous dirigent dans ce sens. C'est cette situation que l'on observe avec le modèle HLHKO. Le laboratoire a démontré un phénomène CASTOR dans le cœur qui est intensifié par une charge en précurseur (KIC). Il y a une corrélation directe entre l'intensification du phénomène CASTOR et l'apparition d'une pathologie cardiaque (hypertrophie). Cette hypothèse pourra être validée également par le croisement de notre modèle HL-Lox avec des souris possédant le transgène Cre exprimé dans différents tissus (autres que le cœur et le foie). Ceci permettra d'étudier l'absence d'HL dans d'autres organes clés des maladies CASTOR. L'invalidation dans certains types de cellules cérébrales permettra, dans un projet futur, d'évaluer l'effet local d'un phénomène CASTOR. Étant donné les nombreux phénotypes reliés au cerveau dans les maladies CASTOR et la présence d'anomalies de la matière blanche chez plusieurs patients déficients en HL, il sera intéressant et pertinent d'effectuer l'invalidation d'HL spécifiquement dans ce tissu. Pour ce faire, une invalidation spécifique dans les cellules gliales serait probablement l'approche à privilégier, principalement dûe au fait que la présence de la voie

de la dégradation de la leucine y a été répertoriée dans la littérature (Cole et al., 2012).

11- Certains traitements pourraient permettre de réduire l'augmentation d'acyls-CoA toxiques.

Mes travaux laissent croire que certains traitements utilisés en clinique tels que la L-carnitine et la glycine, s'ils sont efficaces pour diminuer la concentration des acyls-CoA accumulés, pourraient apporter un effet bénéfique pour contrer ou diminuer le phénomène CASTOR. Mes travaux ont mis la table afin de pouvoir tester cette hypothèse dans un futur rapproché.

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS

Les travaux présentés dans cette thèse permettent les conclusions suivantes. Énumérons-les selon la liste des hypothèses élaborées à la fin de l'introduction. Mentionnons d'abord que les souris HLLKO présentent les signes cardinaux retrouvés dans plusieurs erreurs innées humaines de la dégradation des acyls-CoA, notamment les crises caractérisées par un coma avec hypoglycémie et hyperammoniémie. C'est le premier modèle qui présente les signes cardinaux d'une maladie héréditaire de la dégradation d'un acyl-CoA où le profil des acyls-CoA hépatiques a pu être étudié de façon systématique.

Les souris HLLKO et SCADD ont des profils anormaux et distincts des acyls-CoA hépatiques. Il s'agit de la première démonstration dans un modèle animal EIMAC, dans une étude contrôlée, de la présence et de la variation dans différents états physiologiques du phénomène CASTOR.

Dans le modèle HLLKO, les relations de la concentration d'un acyl-CoA hépatique et de l'acide organique urinaire correspondant varient grandement d'un acyl-CoA à l'autre. Le profil des acides organiques urinaires n'est pas corrélé de façon linéaire avec l'intensité du phénomène CASTOR intrahépatique.

Au cours des crises hypoglycémiques et hyperammoniémiques des souris HLLKO, on trouve dans le foie une diminution de l'acétyl-CoA mais

aussi une augmentation d'acyls-CoA inhibiteurs, une combinaison qui augmente le potentiel toxique de l'accumulation anormale des acyls-CoA.

Les résultats présentés dans cette thèse proposent un lien direct entre la déficience enzymatique et des signes centraux des EIMAC avec comme élément déclencheur de la physiopathologie, le phénomène CASTOR.

Deux états cliniques distincts sont présents dans les maladies CASTOR: aigu et chronique.

Pour les souris HLLKO, une intensification du phénomène CASTOR est observée lors de l'état aigu. Cette observation est en accord avec l'hypothèse d'un seuil critique du phénomène CASTOR, qui une fois franchi, rend impossible l'équilibre physiologique sans support médical.

Les souris HLLKO démontrent le rôle central du foie dans le développement des signes cardinaux des EIMAC tel que le coma, l'hypoglycémie et l'hyperammoniémie.

Les souris HLHKO démontrent qu'un déséquilibre CASTOR extra-hépatique est associé au développement de signes cardinaux des maladies EIMAC qui sont retrouvés spécifiquement dans l'organe invalidé, même en présence d'un foie normal.

Nos données proposent une nouvelle façon de voir et de comprendre un groupe majeur des maladies métaboliques héréditaires, EIMAC, basée sur le rôle central des acyls-CoA. Nous pouvons maintenant tracer une chaîne ininterrompue d'événements métaboliques qui suffit à produire des signes cardinaux communs à plusieurs maladies de ce groupe. Une approche similaire pourra être appliquée afin d'explorer l'importance du phénomène CASTOR dans d'autres organes et dans différentes maladies héréditaires et acquises du métabolisme mitochondriale.

Une connaissance des niveaux d'acyls-CoA et de leurs effets physiologiques pourra contribuer à une meilleure prise en charge de ces patients grâce à une meilleure connaissance de la physiopathologie. Ceci pourrait mener à la découverte de nouvelles avenues thérapeutiques pour ces patients.

En ouverture, il sera intéressant de démontrer le phénomène CASTOR à l'aide d'autres modèles animaux des EIMAC. Il serait également intéressant de doser les acyls-CoA sur des biopsies de patients. Des résultats

préliminaires sur un modèle animal de déficience en biotinidase a permis d'observer également un phénomène CASTOR avec une augmentation des concentrations d'isovaléryl-CoA et de 3-OH-isovaléryl-CoA et une diminution d'acétyl-CoA.

Sur le modèle HL, il sera intéressant de tester des toxines connues pour induire une décompensation typique des maladies CASTOR (benzoate, aspirine, hypoglycine, etc...) afin de mieux définir le phénomène CASTOR et comment le métabolisme réagit. Une étude enzymologique plus détaillée afin d'évaluer l'impact du phénomène CASTOR serait également intéressante et permettrait de mieux comprendre la crise métabolique en plus d'obtenir de nouvelles cibles thérapeutiques. Ceci pourrait inclure l'impact précis d'acyl-CoA dont la concentration est perturbée sur les enzymes susceptibles d'être inhibées. Une étude plus détaillée de la morphologie mitochondriale serait également centrale à la suite du projet. Et ce afin d'expliquer la présence des mégamitochondries et bien évaluer l'impact de ce phénotype sur la crise métabolique.

Il sera intéressant également d'étudier la déficience en HL dans d'autres organes clés des maladies CASTOR (cerveau, cœur, muscles, etc...). Certains patients atteints d'une déficience en HL vont développer des complications spécifiques à ces organes. D'ailleurs, des résultats préliminaires sur la déficience en HL dans le cœur ont permis de détecter un phénomène

CASTOR et d'observer une insuffisance cardiaque lorsque la voie de dégradation de la leucine est surchargée. Il serait également intéressant de croiser notre souris HLLKO avec une souris portant la mutation HL constitutive afin d'obtenir une souris avec une déficience complète dans les hépatocytes et une déficience partielle dans le reste du corps et de comparer avec le modèle HLLKO. Le laboratoire travaille également sur la mise au point d'une thioesthérase (Acot8) qui serait directement transportée dans la mitochondrie afin d'évaluer son efficacité à corriger le phénomène CASTOR et voir s'il pourrait y avoir une efficacité pour le traitement de la crise métabolique. Mes travaux ne font qu'ouvrir un nouveau champ d'étude qui est promis à un bel avenir et permettent d'espérer une meilleure prise en charge de ces patients.

BIBLIOGRAPHIE

Ashmarina, L.I., Pshezhetsky, A.V., Branda, S.S., Isaya, G., and Mitchell, G.A. (1999). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase: targeting and processing in peroxisomes and mitochondria. *J Lipid Res* 40, 70-75.

Ashmarina, L.I., Rusnak, N., Mizioro, H.M., and Mitchell, G.A. (1994). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase is present in mouse and human liver peroxisomes. *J Biol Chem* 269, 31929-31932.

Barrit, G.J. (1985). Regulation of enzymatic activity. In *Pyruvate Carboxylase*. D.B. Keech, and J.C. Wallace, eds. (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 179-248.

Blake, O.A., Bennink, M.R., and Jackson, J.C. (2006). Ackee (*Blighia sapida*) hypoglycin A toxicity: dose response assessment in laboratory rats. *Food Chem Toxicol* 44, 207-213.

Bouchard, L., Robert, M.F., Vinarov, D., Stanley, C.A., Thompson, G.N., Morris, A., Leonard, J.V., Quant, P., Hsu, B.Y., Boneh, A., et al. (2001). Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase deficiency: clinical course and description of causal mutations in two patients. *Pediatr Res* 49, 326-331.

Boukaftane, Y., Duncan, A., Wang, S., Labuda, D., Robert, M.F., Sarrazin, J., Schappert, K., and Mitchell, G.A. (1994). Human mitochondrial HMG CoA synthase: liver cDNA and partial genomic cloning, chromosome mapping to 1p12-p13, and possible role in vertebrate evolution. *Genomics* 23, 552-559.

Boukaftane, Y., and Mitchell, G.A. (1997). Cloning and characterization of the human mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase gene. *Gene* 195, 121-126.

Buemi, M., Floccari, F., Nostro, L., Campo, S., Caccamo, C., Sturiale, A., Aloisi, C., Giacobbe, M.S., and Frisina, N. (2007). Statins in the prevention of cardiovascular events in patients with renal failure. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* 7, 7-13.

Cahill, G.F., Jr., Herrera, M.G., Morgan, A.P., Soeldner, J.S., Steinke, J., Levy, P.L., Reichard, G.A., Jr., and Kipnis, D.M. (1966). Hormone-fuel interrelationships during fasting. *J Clin Invest* 45, 1751-1769.

Cardoso, M.L., Rodrigues, M.R., Leao, E., Martins, E., Diogo, L., Rodrigues, E., Garcia, P., Rolland, M.O., and Vilarinho, L. (2004). The E37X is a common HMGCL mutation in Portuguese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaric CoA lyase deficiency. *Molecular genetics and metabolism* 82, 334-338.

Chalasani, S., and Fischer, J. (2008). South Beach Diet associated ketoacidosis: a case report. *J Med Case Reports* 2, 45.

Chandler, R.J., Zervas, P.M., Shanske, S., Sloan, J., Hoffmann, V., DiMauro, S., and Venditti, C.P. (2009). Mitochondrial dysfunction in mutant methylmalonic acidemia. *FASEB J* 23, 1252-1261.

Chen, T.Y., Smith, W., Rosenstock, J.L., and Lessnau, K.D. (2006). A life-threatening complication of Atkins diet. *Lancet* 367, 958.

Cole, J.T., Sweatt, A.J., and Hutson, S.M. (2012). Expression of mitochondrial branched-chain aminotransferase and alpha-keto-acid dehydrogenase in rat brain: implications for neurotransmitter metabolism. *Frontiers in neuroanatomy* 6, 18.

Corkey, B.E., Brandt, M., Williams, R.J., and Williamson, J.R. (1981). Assay of short-chain acyl coenzyme A intermediates in tissue extracts by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 118, 30-41.

Corkey, B.E., and Deeney, J.T. (1990). Acyl CoA regulation of metabolism and signal transduction. *Prog Clin Biol Res* 321, 217-232.

Corkey, B.E., Hale, D.E., Glennon, M.C., Kelley, R.I., Coates, P.M., Kilpatrick, L., and Stanley, C.A. (1988). Relationship between unusual hepatic acyl coenzyme A profiles and the pathogenesis of Reye syndrome. *J Clin Invest* 82, 782-788.

Corkey, B.E., Martin-Requero, A., Walajtys-Rode, E., Williams, R.J., and Williamson, J.R. (1982). Regulation of the branched chain alpha-ketoacid pathway in liver. *J Biol Chem* 257, 9668-9676.

Coude, F.X., Grimber, G., Parvy, P., Rabier, D., and Petit, F. (1983). Inhibition of ureagenesis by valproate in rat hepatocytes. Role of N-acetylglutamate and acetyl-CoA. *Biochem J* 216, 233-236.

Coude, F.X., Sweetman, L., and Nyhan, W.L. (1979). Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. *J Clin Invest* 64, 1544-1551.

DiMauro, S., Hirano, M., and Schon, E. (2006). Mitochondrial medicine. (Informa healthcare).

Dodson, W.E., Prensky, A.L., DeVivo, D.C., Goldring, S., and Dodge, P.R. (1976). Management of seizure disorders: selected aspects. Part II. *J Pediatr* 89, 695-703.

Falk, R.E., Cederbaum, S.D., Blass, J.P., Gibson, G.E., Kark, R.A., and Carrel, R.E. (1976). Ketonic diet in the management of pyruvate dehydrogenase deficiency. *Pediatrics* 58, 713-721.

Faull, K., Bolton, P., Halpern, B., Hammond, J., Danks, D.M., Hahnel, R., Wilkinson, S.P., Wysocki, S.J., and Masters, P.L. (1976). Letter: Patient with defect in leucine metabolism. *The New England journal of medicine* 294, 1013.

Fenselau, A., and Wallis, K. (1974). Ketone body usage by mammals. Acetoacetate substrate inhibition of CoA transferase from various rat tissues. *Life Sci* 15, 811-818.

Forouhar, F., Hussain, M., Farid, R., Benach, J., Abashidze, M., Edstrom, W.C., Vorobiev, S.M., Xiao, R., Acton, T.B., Fu, Z., et al. (2006). Crystal structures of two bacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyases suggest a common catalytic mechanism among a family of TIM barrel metalloenzymes cleaving carbon-carbon bonds. *The Journal of biological chemistry* 281, 7533-7545.

Fortier, M., Wang, S.P., Mauriege, P., Semache, M., Mfuma, L., Li, H., Levy, E., Richard, D., and Mitchell, G.A. (2004). Hormone-sensitive lipase-independent adipocyte lipolysis during beta-adrenergic stimulation, fasting, and dietary fat loading. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E282-288.

Fu, Z., Runquist, J.A., Montgomery, C., Miziorko, H.M., and Kim, J.J. (2010). Functional insights into human HMG-CoA lyase from structures of Acyl-CoA-containing ternary complexes. *J Biol Chem* 285, 26341-26349.

Fukao, T., Lopaschuk, G.D., and Mitchell, G.A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 243-251.

Fung, C.-H. (1971a). The regulatory properties and reaction mechanism of chicken liver pyruvate carboxylase (Ph.D. Thesis). (Cleveland: Case Western Reserve University).

Fung, C.-H. (1971b). The regulatory properties and reaction mechanism of chicken liver pyruvate carboxylase. (Cleveland: Case Western Reserve University).

Gao, L., Chiou, W., Tang, H., Cheng, X., Camp, H.S., and Burns, D.J. (2007). Simultaneous quantification of malonyl-CoA and several other short-chain acyl-CoAs in animal tissues by ion-pairing reversed-phase HPLC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 853, 303-313.

Gibson, K.M., Cassidy, S.B., Seaver, L.H., Wanders, R.J., Kennaway, N.G., Mitchell, G.A., and Spark, R.P. (1994). Fatal cardiomyopathy associated with

3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 17, 291-294.

Guerra, C., Koza, R.A., Walsh, K., Kurtz, D.M., Wood, P.A., and Kozak, L.P. (1998). Abnormal nonshivering thermogenesis in mice with inherited defects of fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 102, 1724-1731.

Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., et al. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737.

Harris, S.R., Zhang, G.F., Sadhukhan, S., Murphy, A.M., Tomcik, K.A., Vazquez, E.J., Anderson, V.E., Tochtrop, G.P., and Brunengraber, H. (2011). Metabolism of levulinate in perfused rat livers and live rats: conversion to the drug of abuse 4-hydroxypentanoate. *J Biol Chem* 286, 5895-5904.

Hayflick, S.J. (2003). Unraveling the Hallervorden-Spatz syndrome: pantothenate kinase-associated neurodegeneration is the name. *Curr Opin Pediatr* 15, 572-577.

Hayflick, S.J., Westaway, S.K., Levinson, B., Zhou, B., Johnson, M.A., Ching, K.H., and Gitschier, J. (2003). Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *N Engl J Med* 348, 33-40.

Hirschey, M.D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D.B., Grueter, C.A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O.R., et al. (2010). SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464, 121-125.

Huttenlocher, P.R. (1976). Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatr Res* 10, 536-540.

Ji, S., You, Y., Kerner, J., Hoppel, C.L., Schoeb, T.R., Chick, W.S., Hamm, D.A., Sharer, J.D., and Wood, P.A. (2008). Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab* 93, 314-322.

Jitrapakdee, S., St Maurice, M., Rayment, I., Cleland, W.W., Wallace, J.C., and Attwood, P.V. (2008). Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 413, 369-387.

Johnson, M.A., Kuo, Y.M., Westaway, S.K., Parker, S.M., Ching, K.H., Gitschier, J., and Hayflick, S.J. (2004). Mitochondrial localization of human PANK2 and hypotheses of secondary iron accumulation in pantothenate kinase-associated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1012, 282-298.

Jones, K.J., Wilcken, B., and Kilham, H. (1997). The long-term evolution of a case of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency associated with deafness and retinitis pigmentosa. *Journal of inherited metabolic disease* 20, 833-834.

Jones, M.G., and Chalmers, R.A. (2000). Artefacts in organic acid analysis: occurrence and origin of partially trimethylsilylated 3-hydroxy-3-methyl carboxylic acids. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 300, 203-212.

Kassovska-Bratinova, S., Fukao, T., Song, X.Q., Duncan, A.M., Chen, H.S., Robert, M.F., Perez-Cerda, C., Ugarte, M., Chartrand, C., Vobecky, S., et al. (1996). Succinyl CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT): human cDNA cloning, human chromosomal mapping to 5p13, and mutation detection in a SCOT-deficient patient. *Am J Hum Genet* 59, 519-528.

Keech, D.W., J.C. (1985). *Pyruvate carboxylase*. (CRC Press).

Kelleher, J.K., and Bryan, B.M., 3rd (1985). A $^{14}\text{CO}_2$ ratios method for detecting pyruvate carboxylation. *Anal Biochem* 151, 55-62.

Kotzbauer, P.T., Truax, A.C., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2005). Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability, and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2. *J Neurosci* 25, 689-698.

Kramer, P.R., and Miziorko, H.M. (1980). Purification and characterization of avian liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase. *The Journal of biological chemistry* 255, 11023-11028.

Kurtz, D.M., Rinaldo, P., Rhead, W.J., Tian, L., Millington, D.S., Vockley, J., Hamm, D.A., Brix, A.E., Lindsey, J.R., Pinkert, C.A., et al. (1998). Targeted disruption of mouse long-chain acyl-CoA dehydrogenase gene reveals crucial roles for fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15592-15597.

Lahjouji, K., Mitchell, G.A., and Qureshi, I.A. (2001). Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency. *Mol Genet Metab* 73, 287-297.

Levrat, V., Forest, I., Fouilhoux, A., Acquaviva, C., Vianey-Saban, C., and Guffon, N. (2008). Carglumic acid: an additional therapy in the treatment of organic acidurias with hyperammonemia? *Orphanet J Rare Dis* 3, 2.

Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Price, W.A., Corkey, B.E., and Stanley, C.A. (1997). Carnitine effects on coenzyme A profiles in rat liver with hypoglycin inhibition of multiple dehydrogenases. *Am J Physiol* 272, E359-366.

Luis, P.B., Ruiter, J.P., L, I.J., Diogo, L., Garcia, P., de Almeida, I.T., Duran, M., Wanders, R.J., and Silva, M.F. (2012). Inhibition of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase explains the increased excretion of 3-hydroxyisovaleric acid in valproate-treated patients. *J Inherit Metab Dis* 35, 443-449.

Mack, M., Schniegler-Mattox, U., Peters, V., Hoffmann, G.F., Liesert, M., Buckel, W., and Zschocke, J. (2006). Biochemical characterization of human 3-methylglutaconyl-CoA hydratase and its role in leucine metabolism. *FEBS J* 273, 2012-2022.

Marliss, E.B., Murray, F.T., and Nakhooda, A.F. (1978). The metabolic response to hypocaloric protein diets in obese man. *J Clin Invest* 62, 468-479.

Martin-Requero, A., Corkey, B.E., Cerdan, S., Walajtys-Rode, E., Parrilla, R.L., and Williamson, J.R. (1983). Interactions between alpha-ketoisovalerate metabolism and the pathways of gluconeogenesis and urea synthesis in isolated hepatocytes. *J Biol Chem* 258, 3673-3681.

Matsusue, K., Haluzik, M., Lambert, G., Yim, S.H., Gavrilova, O., Ward, J.M., Brewer, B., Jr., Reitman, M.L., and Gonzalez, F.J. (2003). Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *The Journal of clinical investigation* 111, 737-747.

Meda, H.A., Diallo, B., Buchet, J.P., Lison, D., Barennes, H., Ouangre, A., Sanou, M., Cousens, S., Tall, F., and Van de Perre, P. (1999). Epidemic of fatal encephalopathy in preschool children in Burkina Faso and consumption of unripe ackee (*Blighia sapida*) fruit. *Lancet* 353, 536-540.

Minkler, P.E., Kerner, J., Kasumov, T., Parland, W., and Hoppel, C.L. (2006). Quantification of malonyl-coenzyme A in tissue specimens by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 352, 24-32.

Mitchell, G.A., and Fukao, T. (2001). Inborn errors of ketone body metabolism. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. C.S. Scriver, Baudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., et al., ed. (McGraw-Hill), pp. 2327 - 2356.

Mitchell, G.A., Fukao, T. (2001). Inborn errors of ketone body metabolism. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C.S. Scriver, Baudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., Vogelstein, B., ed. (McGraw-Hill Professional), pp. 2327 - 2356.

Mitchell, G.A., Gauthier, N., Lesimple, A., Wang, S.P., Mamer, O., and Qureshi, I. (2008). Hereditary and acquired diseases of acyl-coenzyme A metabolism. *Mol Genet Metab* 94, 4-15.

Mitchell, G.A., Kassovska-Bratinova, S., Boukaftane, Y., Robert, M.F., Wang, S.P., Ashmarina, L., Lambert, M., Lapierre, P., and Potier, E. (1995). Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin Invest Med* 18, 193-216.

Mitchell, G.A., Ozand, P.T., Robert, M.F., Ashmarina, L., Roberts, J., Gibson, K.M., Wanders, R.J., Wang, S., Chevalier, I., Plochl, E., et al. (1998). HMG CoA lyase deficiency: identification of five causal point mutations in codons 41 and 42, including a frequent Saudi Arabian mutation, R41Q. *Am J Hum Genet* 62, 295-300.

Mitchell, G.A., Robert, M.F., Hruz, P.W., Wang, S., Fontaine, G., Behnke, C.E., Mende-Mueller, L.M., Schappert, K., Lee, C., Gibson, K.M., et al. (1993). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase (HL). Cloning of human and chicken liver HL cDNAs and characterization of a mutation causing human HL deficiency. *J Biol Chem* 268, 4376-4381.

Montgomery, C., Pei, Z., Watkins, P.A., and Mizioroko, H.M. (2012). Identification and characterization of an extramitochondrial human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *The Journal of biological chemistry* 287, 33227-33236.

Murray, R.K.G., D.K.; Mayes, P.A.; Rodell, V.W. (2000). *Harper's Biochemistry*.

Nakanishi, T., Funahashi, S., Shimizu, A., and Hayashi, A. (1990). Urinary organic acids in elderly Japanese patients with ketosis and encephalopathy who have taken panto-yl-gamma-aminobutyrate, calcium salt (calcium hopantenate, HOPA). *Clin Chim Acta* 188, 85-90.

Noda, S., Haratake, J., Sasaki, A., Ishii, N., Umezaki, H., and Horie, A. (1991). Acute encephalopathy with hepatic steatosis induced by pantothenic acid antagonist, calcium hopantenate, in dogs. *Liver* 11, 134-142.

Noda, S., Umezaki, H., Yamamoto, K., Araki, T., Murakami, T., and Ishii, N. (1988). Reye-like syndrome following treatment with the pantothenic acid antagonist, calcium hopantenate. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51, 582-585.

Nyman, L.R., Cox, K.B., Hoppel, C.L., Kerner, J., Barnoski, B.L., Hamm, D.A., Tian, L., Schoeb, T.R., and Wood, P.A. (2005). Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1a (liver isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab* 86, 179-187.

Otsuka, M., Akiba, T., Okita, Y., Tomita, K., Yoshiyama, N., Sasaoka, T., Kanayama, M., and Marumo, F. (1990). Lactic acidosis with hypoglycemia and hyperammonemia observed in two uremic patients during calcium hopantenate treatment. *Jpn J Med* 29, 324-328.

Owen, O.E., Felig, P., Morgan, A.P., Wahren, J., and Cahill, G.F., Jr. (1969). Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48, 574-583.

Owen, O.E., Morgan, A.P., Kemp, H.G., Sullivan, J.M., Herrera, M.G., and Cahill, G.F., Jr. (1967). Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46, 1589-1595.

Owen, O.E., Reichard, G.A., Jr., Boden, G., and Shuman, C. (1974). Comparative measurements of glucose, beta-hydroxybutyrate, acetoacetate, and insulin in blood and cerebrospinal fluid during starvation. *Metabolism* 23, 7-14.

Palladino, A.A., Chen, J., Kallish, S., Stanley, C.A., and Bennett, M.J. (2012). Measurement of tissue acyl-CoAs using flow-injection tandem mass spectrometry: acyl-CoA profiles in short-chain fatty acid oxidation defects. *Molecular genetics and metabolism* 107, 679-683.

Pie, J., Lopez-Vinas, E., Puisac, B., Menao, S., Pie, A., Casale, C., Ramos, F.J., Hegardt, F.G., Gomez-Puertas, P., and Casals, N. (2007). Molecular genetics of HMG-CoA lyase deficiency. *Mol Genet Metab* 92, 198-209.

Pindolia, K., Jordan, M., Guo, C., Matthews, N., Mock, D.M., Strovel, E., Blitzner, M., and Wolf, B. (2011). Development and characterization of a mouse with profound biotinidase deficiency: a biotin-responsive neurocutaneous disorder. *Mol Genet Metab* 102, 161-169.

Powell-Jackson, P.R., Tredger, J.M., and Williams, R. (1984). Hepatotoxicity to sodium valproate: a review. *Gut* 25, 673-681.

Puisac, B., Lopez-Vinas, E., Moreno, S., Mir, C., Perez-Cerda, C., Menao, S., Lluch, D., Pie, A., Gomez-Puertas, P., Casals, N., et al. (2005). Skipping of exon 2 and exons 2 plus 3 of HMG-CoA lyase (HL) gene produces the loss of beta sheets 1 and 2 in the recently proposed (beta-alpha)⁸ TIM barrel model of HL. *Biophys Chem* 115, 241-245.

Reye, R.D., Morgan, G., and Baral, J. (1963). Encephalopathy and Fatty Degeneration of the Viscera. A Disease Entity in Childhood. *Lancet* 2, 749-752.

Roe, C., and Coates, P.M. (1989). Acyl-CoA dehydrogenase deficiencies. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. C.S. Scriver, Baudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., et al., ed. (McGraw-Hill), pp. 889-914.

Sasaki, T., Minagawa, M., Yamamoto, T., and Ichihashi, H. (1991). A case of the Rett syndrome with acute encephalopathy induced during calcium hopantenate treatment. *Brain Dev* 13, 52-55.

Schuler, A.M., Gower, B.A., Matern, D., Rinaldo, P., Vockley, J., and Wood, P.A. (2005). Synergistic heterozygosity in mice with inherited enzyme deficiencies of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *Mol Genet Metab* 85, 7-11.

Schuler, A.M., and Wood, P.A. (2002). Mouse models for disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *ILAR J* 43, 57-65.

Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in cell biology* 13, 29-83.

Serra, D., Casals, N., Asins, G., Royo, T., Ciudad, C.J., and Hegardt, F.G. (1993). Regulation of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase protein by starvation, fat feeding, and diabetes. *Arch Biochem Biophys* 307, 40-45.

Shah, P., and Isley, W.L. (2006). Ketoacidosis during a low-carbohydrate diet. *N Engl J Med* 354, 97-98.

Shevell, M. (2003). Hallervorden and history. *N Engl J Med* 348, 3-4.

Shimazu, T., Hirschey, M.D., Hua, L., Dittenhafer-Reed, K.E., Schwer, B., Lombard, D.B., Li, Y., Bunkenborg, J., Alt, F.W., Denu, J.M., et al. (2010). SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell metabolism* 12, 654-661.

Silva, M.F., Aires, C.C., Luis, P.B., Ruiter, J.P., L, I.J., Duran, M., Wanders, R.J., and Tavares de Almeida, I. (2008). Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *Journal of inherited metabolic disease* 31, 205-216.

Sirois, J., Cote, J.F., Charest, A., Uetani, N., Bourdeau, A., Duncan, S.A., Daniels, E., and Tremblay, M.L. (2006). Essential function of PTP-PEST during mouse embryonic vascularization, mesenchyme formation, neurogenesis and early liver development. *Mechanisms of development* 123, 869-880.

Stacey, T.E., de Sousa, C., Tracey, B.M., Whitelaw, A., Mistry, J., Timbrell, P., and Chalmers, R.A. (1985). Dizygotic twins with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria; unusual presentation, family studies and dietary management. *European journal of pediatrics* 144, 177-181.

Strzelecki, T., Thomas, J.A., Koch, C.D., and LaNoue, K.F. (1984). The effect of hormones on proton compartmentation in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 259, 4122-4129.

Sweetman, L., and Williams, J.C. (2001). Branched Chain Organic Aciduria. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. C.S. Scriver,

Baudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., et al., ed. (McGraw-Hill), pp. 2125-2163.

Sweetman, L., Williams, J.C. (2001). Branched Chain Organic Acidurias. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. C.S. Scriver, Beaudet, A., Sly, W., Valle, D., ed. (New York: McGraw Hill), pp. 2125 - 2163.

Swink, T.D., Vining, E.P., and Freeman, J.M. (1997). The ketogenic diet: 1997. *Adv Pediatr* 44, 297-329.

Tahiliani, A.G. (1989). Dependence of mitochondrial coenzyme A uptake on the membrane electrical gradient. *J Biol Chem* 264, 18426-18432.

Tahiliani, A.G., and Beinlich, C.J. (1991). Pantothenic acid in health and disease. *Vitam Horm* 46, 165-228.

Tanaka, K., Miller, E.M., and Isselbacher, K.J. (1971). Hypoglycin A: a specific inhibitor of isovaleryl CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 20-24.

Tholen, H., and Mordhorst, R. (1976). Hepatic and cerebral coenzyme A contents after intravenous injection of coenzyme A in rats. *Experientia* 32, 830-832.

Thompson, G.N., Chalmers, R.A., and Halliday, D. (1990). The contribution of protein catabolism to metabolic decompensation in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *Eur J Pediatr* 149, 346-350.

Tolwani, R.J., Hamm, D.A., Tian, L., Sharer, J.D., Vockley, J., Rinaldo, P., Matern, D., Schoeb, T.R., and Wood, P.A. (2005). Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in gene-targeted mice. *PLoS Genet* 1, e23.

Tucci, S., Primassin, S., Ter Veld, F., and Spiekerkoetter, U. (2010). Medium-chain triglycerides impair lipid metabolism and induce hepatic steatosis in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)-deficient mice. *Mol Genet Metab* 101, 40-47.

Tuchman, M., Caldovic, L., Daikhin, Y., Horyn, O., Nissim, I., Korson, M., Burton, B., and Yudkoff, M. (2008). N-carbamylglutamate markedly enhances ureagenesis in N-acetylglutamate deficiency and propionic acidemia as measured by isotopic incorporation and blood biomarkers. *Pediatr Res* 64, 213-217.

Tuinstra, R.L., Wang, C.Z., Mitchell, G.A., and Miziorko, H.M. (2004). Evaluation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase arginine-41 as a catalytic residue: use of acetyldithio-coenzyme A to monitor product enolization. *Biochemistry* 43, 5287-5295.

Vazquez, J.A., Morse, E.L., and Adibi, S.A. (1985). Effect of dietary fat, carbohydrate, and protein on branched-chain amino acid catabolism during caloric restriction. *The Journal of clinical investigation* 76, 737-743.

Wang, S.P., Marth, J.D., Oligny, L.L., Vachon, M., Robert, M.F., Ashmarina, L., and Mitchell, G.A. (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase (HL): gene targeting causes prenatal lethality in HL-deficient mice. *Hum Mol Genet* 7, 2057-2062.

Wang, S.P., Robert, M.F., Gibson, K.M., Wanders, R.J., and Mitchell, G.A. (1996). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL): mouse and human HL gene (HMGCL) cloning and detection of large gene deletions in two unrelated HL-deficient patients. *Genomics* 33, 99-104.

Weisend, C.M., Kundert, J.A., Suvorova, E.S., Prigge, J.R., and Schmidt, E.E. (2009). Cre activity in fetal albCre mouse hepatocytes: Utility for developmental studies. *Genesis* 47, 789-792.

Williamson, D.H., Bates, M.W., and Krebs, H.A. (1968). Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone-body metabolism in rat liver. *The Biochemical journal* 108, 353-361.

Wilson, W.G., Cass, M.B., Sovik, O., Gibson, K.M., and Sweetman, L. (1984). A child with acute pancreatitis and recurrent hypoglycemia due to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency. *European journal of pediatrics* 142, 289-291.

Wimhurst, J.M., and Manchester, K.L. (1970). Some aspects of the kinetics of rat liver pyruvate carboxylase. *The Biochemical journal* 120, 79-93.

Wohlhueter, R.M., and Harper, A.E. (1970). Coinduction of rat liver branched chain alpha-keto acid dehydrogenase activities. *The Journal of biological chemistry* 245, 2391-2401.

Wolfgang, M.J., Kurama, T., Dai, Y., Suwa, A., Asaumi, M., Matsumoto, S., Cha, S.H., Shimokawa, T., and Lane, M.D. (2006). The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7282-7287.

Wood, P.A., Amendt, B.A., Rhead, W.J., Millington, D.S., Inoue, F., and Armstrong, D. (1989). Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in mice. *Pediatr Res* 25, 38-43.

Wu, J.W., Wang, S.P., Alvarez, F., Casavant, S., Gauthier, N., Abed, L., Soni, K.G., Yang, G., and Mitchell, G.A. (2011). Deficiency of liver adipose triglyceride lipase in mice causes progressive hepatic steatosis. *Hepatology* 54, 122-132.

Zeczycki, T.N., Maurice, M.S., and Attwood, P.V. (2010). Inhibitors of Pyruvate Carboxylase. *Open Enzym Inhib J* 3, 8-26.

Zhang, D., Liu, Z.X., Choi, C.S., Tian, L., Kibbey, R., Dong, J., Cline, G.W., Wood, P.A., and Shulman, G.I. (2007a). Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17075-17080.

Zhang, Y.M., Chohnan, S., Virga, K.G., Stevens, R.D., Ilkayeva, O.R., Wenner, B.R., Bain, J.R., Newgard, C.B., Lee, R.E., Rock, C.O., et al. (2007b). Chemical knockout of pantothenate kinase reveals the metabolic and genetic program responsible for hepatic coenzyme A homeostasis. *Chem Biol* 14, 291-302.

Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., et al. (2010). Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327, 1000-1004.